

Aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Orthopädie und Arthroseforschung  
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar  
Prof. Dr. med. H. Madry

# **Lokale Stimulation der Knorpelreparatur durch Gentransfer**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2014

vorgelegt von: David Alexander Arntzen  
geboren am: 12.08.1979

**Für Sara, Lukas und meine Lieben**

# Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Zusammenfassung/Abstract</b>	1
2.	<b>Einleitung</b>	3
2.1	Problematik	3
2.2	Metabolismus, Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels	4
2.3	Einteilung und Reparatur von Knorpeldefekten	7
2.4	Operative Therapie von Gelenkknorpeldefekten	8
2.5	Wachstumsfaktoren	10
2.6	Prinzipien des Gentransfers	12
2.7	Eigene Fragestellung	14
3.	<b>Material und Methoden</b>	15
3.1	Material	15
3.1.1	Versuchstiere	15
3.2	Methoden	15
3.2.1	Chondrozyten, Zellkultur, Transfektion, Alginatshäroide	15
3.2.2	Operation	16
3.2.3	Tötung der Versuchstiere	17
3.2.4	Herstellung der histologischen Präparate	17
3.2.5	Histologische Auswertung	20
3.2.6	Histomorphometrische Auswertung	24
3.2.7	Statistische Auswertung	26
4.	<b>Ergebnisse</b>	27
4.1	Alginatfläche im Reparaturgewebe	27
4.2	Synovialmembran-Bewertungssystem	29
4.3	Strukturelle Knorpelreparatur nach 3 und 14 Wochen	30
4.4	Quantifizierung individueller Parameter des Reparaturgewebes	35
4.4.1	Prozentualer Anteil an Safranin-O-positivem Reparaturgewebe	35
4.4.2	Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe	37

4.4.3	Prozentualer Anteil an hypertrophem Gewebe	38
4.5	Zelldichte im Defekt	39
4.6	Immunhistochemie	40
4.6.1	Typ-II-Kollagen	40
4.6.2	Typ-I-Kollagen	41
5.	<b>Diskussion</b>	42
5.1	Überblick	42
5.2	Gentherapie und Gentransfer	42
5.3	Tiermodelle	43
5.4	Alginate als Trägermaterial für transplantierte Chondrozyten	44
5.5	Vergleich von Histomorphometrie und histologischen Bewertungssystemen	46
5.6	Synovialmembran	47
5.7	Typ-I/-II-Kollagengehalt im Reparaturgewebe	48
5.8	Strukturelle Knorpelreparatur	49
5.8.1	Knorpelreparatur nach 3 Wochen <i>in vivo</i>	49
5.8.2	Knorpelreparatur nach 14 Wochen <i>in vivo</i>	50
5.9	Ausblick	54
6.	<b>Literaturverzeichnis</b>	55
7.	<b>Publikationen</b>	70
8.	<b>Danksagung</b>	71
9.	<b>Lebenslauf</b>	72

## Abbildungen

Abb. 2.1	Zonen des Gelenkknorpels
Abb. 4.1	Histologische Darstellung der Alginatsphäroide
Abb. 4.2	Histologische Bilder des Reparaturgewebes nach 3 Wochen
Abb. 4.3	Histologische Bilder des Reparaturgewebes nach 14 Wochen

## Tabellen

Tab. 3.1	Bewertungssystem der Knorpelreparatur nach Sellers
Tab. 3.2	Synovialmembran-Bewertungssystem nach Fortier
Tab. 4.1	Synovialmembran-Bewertungssystem nach 3 Wochen
Tab. 4.2	Synovialmembran-Bewertungssystem nach 14 Wochen
Tab. 4.3	Defekt-Bewertungssystem nach 3 Wochen
Tab. 4.4	Defekt-Bewertungssystem nach 14 Wochen
Tab. 4.5	Zellzahl/mm <sup>2</sup> im Reparaturgewebe nach 3 Wochen
Tab. 4.6	Zellzahl/mm <sup>2</sup> im Reparaturgewebe nach 14 Wochen
Tab. 4.7	Immunreaktivität auf Typ-II-Kollagen
Tab. 4.8	Immunreaktivität auf Typ-I-Kollagen

## Diagramme

Diagramm 4.1	Defektfüllung mit Safranin-O-pos. Gewebe nach 3 Wochen
Diagramm 4.2	Defektfüllung mit Safranin-O-pos. Gewebe nach 14 Wochen
Diagramm 4.3	Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe nach 3 Wochen
Diagramm 4.4	Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe nach 14 Wochen

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ø	Durchmesser
°C	Grad Celsius
®	Registered
Abb.	Abbildung
APES	Aminopropyl-triethoxysilan
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
et. al	et aliae/et alii
FeCl <sub>3</sub>	Eisen(III)-chlorid
g	Gramm
G	Gauge
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
H <sub>2</sub> O	Wasser
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
M	Molar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Na	Natrium

NaCl	Natriumchlorid
n.b.	nicht bestimmt
ng	Nanogramm
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
RNS	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SD	Standard deviation, Standardabweichung
Tab.	Tabelle
U	Unit
vs.	versus
VT	Versuchstier
z.B.	zum Beispiel

## 1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Reparatur von osteochondralen Gelenkknorpeldefekten durch die Transplantation von in Alginat verkapselten Chondrozyten, die den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 überexprimieren, beeinflusst wird.

In der Trochlea femoris von 14 juvenilen weiblichen Chinchilla Bastard Kaninchen wurde ein osteochondraler Defekt mit einem Durchmesser von 3,2 mm gesetzt. Gelenkknorpelzellen, die das *lacZ*-Gen von *E.coli* oder eine humane FGF-2-cDNS überexprimierten, wurden in Alginat verkapselt und in die osteochondralen Defekte eingebracht. Nach 3 und 14 Wochen erfolgte die Tötung von jeweils 7 Versuchstieren. Daraufhin wurden die entnommenen Femora der histologischen Aufarbeitung zugeführt. Die Präparate wurden mit Safranin-Orange/Echtgrün und Hämatoxylin-Eosin gefärbt und nach dem histologischen Bewertungssystem nach Sellers und per computergestützter histomorphometrischer Methoden ausgewertet. Typ-I- und -II-Kollagen wurde immunhistochemisch dargestellt. Ferner untersuchten wir Proben der Synovialmembran mittels des histologischen Bewertungssystems nach Fortier.

Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich ein signifikant verbesserter Gesamtpunktwert des histologischen Bewertungssystems. Ebenso fand sich eine signifikante Verbesserung von Einzelparametern der Chondrogenese wie z.B. der Zellmorphologie und der Defektarchitektur. Histologisch fanden sich zu beiden Zeitpunkten keine negativen Effekte auf die Synovialmembran. Mittels Histomorphometrie konnte nachgewiesen werden, dass das transplantierte Alginat im Laufe der Zeit resorbiert wird.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die lokale Überexpression von FGF-2 die Heilungsvorgänge an osteochondralen Defekten über eine verstärkte Chondrogenese stimuliert. Diese Ergebnisse können zur Entwicklung von genbasierten Strategien zur Therapie von Knorpeldefekten bei Patienten beitragen. Dieses genbasierte Therapiemodell einer lokalen Synthese von therapeutischen Faktoren kann auch als Prototyp dienen, um die Wirkung anderer potentieller therapeutischer Moleküle zu eruieren. Es wird in Zukunft wichtig sein, andere Wachstumsfaktoren zu testen, um die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten weiter zu verbessern.



## 1. Abstract

The aim of this study was to test the hypothesis that gene transfer of human fibroblast growth factor 2 via transplantation of encapsulated genetically modified chondrocytes stimulates chondrogenesis in cartilage defects *in vivo*.

An osteochondral defect was created in the facies patellaris of the femoral condyle of 14 juvenile female Chinchilla bastard rabbits. Lapine articular chondrocytes overexpressing a *lacZ* or a human FGF-2 gene sequence were encapsulated in alginate. The resulting spheres were applied to cartilage defects. After 3 and 14 weeks the animals were sacrificed and the femora were histologically prepared. Serial slices stained with safranin-O, hematoxylin and eosin and by immunochemistry were analysed by a histological score (Sellers) and computer-based histomorphometrical methods. The synovial membrane was also evaluated by a histological score (Fortier).

Overall articular cartilage repair was significantly improved at both time points. Also individual parameters of chondrogenesis, such as the cell morphology and architecture of the new tissue were improved. Histological analysis revealed no adverse pathologic effects on the synovial membrane at any time point. Between 3 and 14 weeks the alginate spheres were progressively resorbed.

In summary the results of the present study demonstrate that localized overexpression of a human FGF-2 gene sequence augments chondrogenesis and enhances articular cartilage *in vivo*, without adverse effects on the synovial membrane. These data might lead to the development of novel gene-based therapies for human articular cartilage defects. This gene-based model of localized synthesis of therapeutic factors may serve as a prototype to examine the effects of other potentially therapeutic molecules on cartilage repair. It will be important to test other growth factors to further enhance articular cartilage repair.

## 2. Einleitung

### 2.1 Problematik

Der hyaline Gelenkknorpel ist eingeschränkt regenerationsfähig (O'Driscoll 1998, Hunziker 2002). Schäden des Gelenkknorpels entstehen durch Arthrose (Buckwalter 2005), Trauma (Braun 2007), Osteochondrosis dissecans (Bruns 1997) oder bei aseptischen Knochennekrosen (Mont 2011). Auf dem Boden vorbestehender Gelenkknorpelschäden kann eine sekundäre Arthrose entstehen (Lotz 2010, Anderson 2011). Oft bleibt als letzte Therapieoption nur die endoprothetische Versorgung (Lützner 2009). Es ist daher sinnvoll einen isolierten Knorpelschaden möglichst frühzeitig und effektiv zu behandeln (Madry 2011). Arthrose ist eine Erkrankung großer sozioökonomischer Bedeutung (Merx 2007).

Knorpeldefekte werden meist nur mit einem mechanisch weniger belastbaren Ersatzgewebe aus Faserknorpel repariert, das vorwiegend aus Kollagen vom Typ I besteht und im Laufe der Zeit degeneriert (Shapiro 1993, Jackson 2001). Das große Spektrum konservativer und operativer Therapieansätze verdeutlicht das ungelöste Problem der Knorpelregeneration: Markraumeröffnende Verfahren streben die Einwanderung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen in den Defekt an, wie die Mikrofrakturierung (Steadman 1999), die Pridie-Bohrung (Pridie 1959) oder die Abrasionsarthroplastik (Johnson 1986). Weiterhin können Knorpel-Knochen-Zylinder aus weniger beanspruchten Teilen des Gelenkes (Minzlaff 2010) transplantiert werden. Außerdem wird die Transplantation von autologen, im Labor vermehrten Chondrozyten durchgeführt (Brittberg 1994), wobei derzeit vor allem biodegradierbare Materialien als Träger dieser Zellen Verwendung finden (Madry 2007).

Während der Reparaturvorgänge von Knorpeldefekten spielen Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle (Trippel 1997, Mariani 2014). Diese Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die über Signalkaskadeprozesse (Fortier 2004) Zellen stimulieren sich zu teilen, zu differenzieren, zu migrieren oder extrazelluläre Matrix zu produzieren (O'Connor 2000). Der wesentliche Nachteil der Applikation von Wachstumsfaktoren ist eine kurze intraartikuläre Halbwertszeit (Chuma 2004). Ein vielversprechender Ansatz hierzu ist die Gentherapie (Evans 2000, Madry 2011). Hierbei werden die therapeutischen Faktoren direkt im Knorpeldefekt produziert und entfalten so vor Ort

gezielt und langfristig ihre Wirkung. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2) ist mitogen für Chondrozyten (Trippel 1993) und stimuliert die Chondrogenese von mesenchymalen Stammzellen (Schofield 1990).

In der vorliegenden Arbeit haben wir den Effekt von FGF-2 auf die Knorpelheilung in einem Tiermodell untersucht. Gelenkknorpelzellen, die das *lacZ*-Gen von *E.coli* oder eine humane FGF-2-cDNS überexprimierten, wurden in Alginat verkapselt und in osteochondrale Defekte von Kaninchen eingebracht. Nach 3 und 14 Wochen erfolgte die Tötung der Versuchstiere. Die Knorpelheilung wurde anhand etablierter histologischer Bewertungssysteme beurteilt.

## **2.2 Metabolismus, Aufbau und Funktion des Gelenkknorpels**

Der hyaline Gelenkknorpel ist ein avaskuläres, alymphatisches, aneurales, bradytrophes Gewebe, das durch Diffusion ernährt wird (Buckwalter 1983, Kuettner 1992, Schiebler 1999, Buckwalter 2005)

### **Chondrozyten**

Gelenkknorpel besteht aus Chondrozyten, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die Chondrozyten produzieren diese Matrix aus Kollagenen und Proteoglykanen, wobei sie nur einen Anteil von unter 10 % am Gewebsvolumen ausmachen. Ferner sind sie für die Homöostase des Gewebes verantwortlich. Sowohl die Matrixkomponenten als auch die sie abbauenden Enzyme, z.B. Kollagenasen, werden von ihnen produziert. Die Aktivität der Chondrozyten und ihre Fähigkeit auf äußere Einflüsse zu reagieren sind altersabhängig. Sobald der Organismus ausgewachsen ist, reduzieren die Chondrozyten ihren Stoffwechsel, ihre Anzahl verringert sich und sie teilen sich nur noch selten (Buckwalter 1998, Martin 2003). Die Ernährung der Chondrozyten erfolgt hauptsächlich über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit. Die intermittierende Belastung des Gelenkes trägt zum Austausch der Flüssigkeit zwischen Gelenkbinnenraum und Knorpelmatrix bei (Ulrich-Vinther 2003).

### **Extrazelluläre Matrix**

Die Knorpelmatrix besteht aus Kollagenen und einer amorphen Grundsubstanz. Diese Grundsubstanz enthält Proteine, vor allem aber Proteoglykane,

makromolekulare Protein-Polysaccharid-Komplexe (Hardingham 1992, Heinegård 2009) sowie Wasser, Salze und weitere niedermolekulare Bestandteile.

Proteoglykane sind aus zahlreichen Proteoglykanuntereinheiten aufgebaut. Diese bestehen aus einem Proteinkern, an den unverzweigte sulfatierte Glucosaminoglykane, wie Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat und Heparansulfat binden. Die Sulfatgruppen der Glucosaminoglykane tragen eine stark negative Ladung. In Verbindung mit Hyaluronsäurekomplexen sind diese Proteoglykane stark hydrophil, was für den hohen hydrodynamischen Druck des Knorpelgewebes verantwortlich ist. Das stark vernetzte Kollagengeflecht wirkt diesem Druck entgegen und bewahrt das Gewebe vor dem Anschwellen. Das für den Gelenkknorpel charakteristische Proteoglykan ist Aggrecan (Dudhia 2005) mit einem Molekulargewicht von 250.000 Da, das zu ca. 90 % aus Kohlehydraten besteht. Vorherrschende Glucosaminoglykane sind Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Weitere kleinere Proteoglykane wie Decorin, Biglykan und Fibromodulin binden an andere Moleküle (z.B. Kollagen II) und helfen so die Matrix zu stabilisieren.

Kollagen vom Typ II ist das Hauptkollagen des hyalinen Knorpels. Es macht etwa 50 % des Trockengewichts und 90-95 % des Gesamtkollagens aus und ist wesentlich für die speziellen Materialeigenschaften des Gelenkknorpels (Bora 1987). Der restliche Anteil besteht aus Kollagen vom Typ I, VI, IX, X und XI.

## Architektur

Der Gelenkknorpel ist in 4 Zonen unterteilt (siehe Abb. 2.1). In der superfiziellen Schicht verlaufen die Kollagenfasern parallel zur Oberfläche. Die Chondrozyten sind inaktiv und haben eine flache Form (Tangentialzone). Hier findet sich die höchste Zelldichte innerhalb des Knorpels. Die sich anschließende Transitionalzone ist bedeutend dicker und beinhaltet sphäroide Chondrozyten und schräg zur Oberfläche verlaufende Kollagenfasern. Die tiefe Basalzone weist senkrecht zur Oberfläche orientierte Kollagenfasern und runde Chondrozyten auf, wobei diese charakteristisch in Säulen angeordnet sind. Die *Tidemark* ist die Grenze zum kalzifizierten Knorpel (Lyons 2005). In der anschließenden Zone des kalzifizierten Knorpels, die reich an Typ-X-Kollagen ist, finden die Kollagenfibrillen eine stabile Insertion. Die Zementlinie trennt die Zone des kalzifizierten Knorpels vom subchondralen Knochen (Madry 2010).

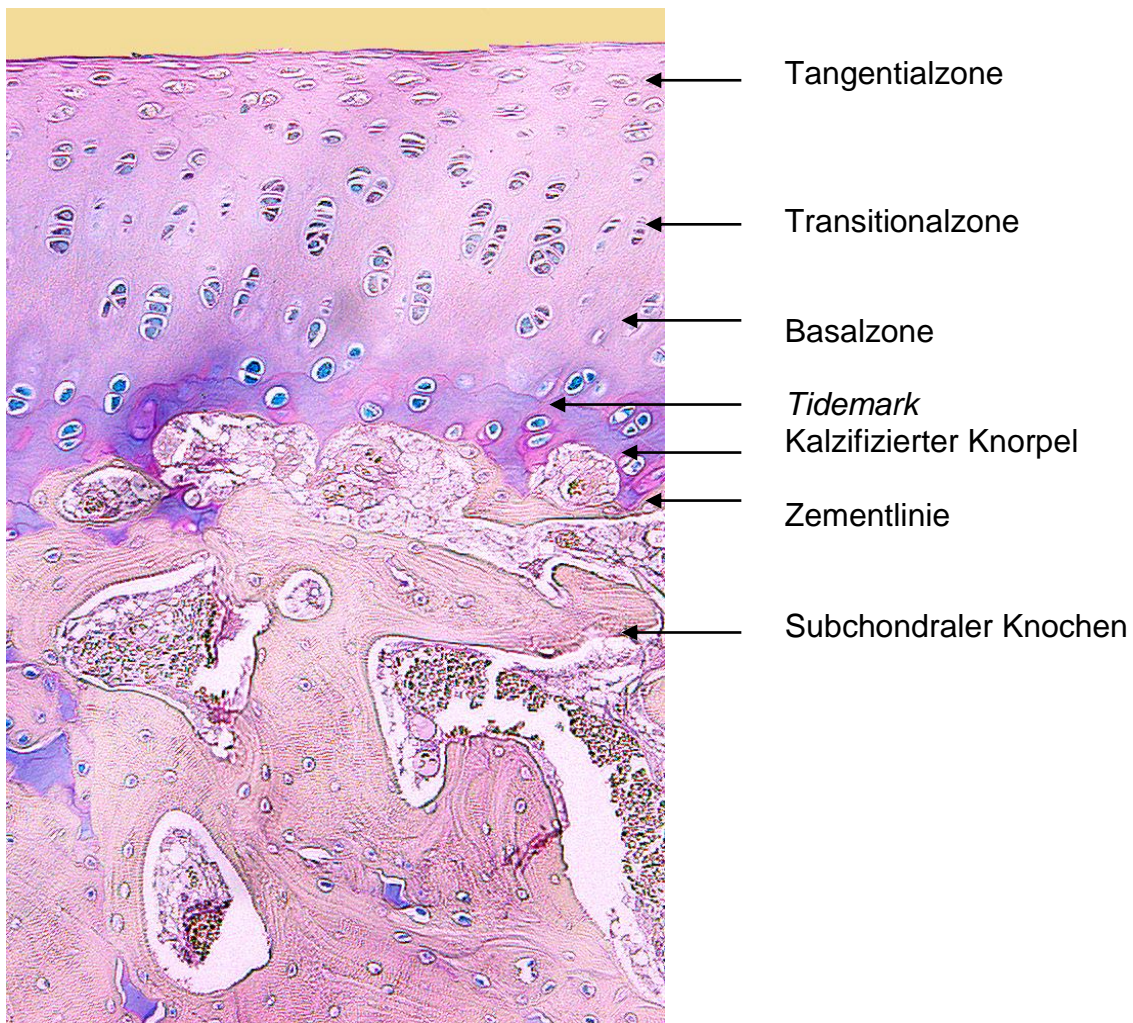


Abb. 2.1: Zonen des Gelenkknorpels, 100-fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE).

### 2.3. Einteilung und Reparatur von Knorpeldefekten

Zwei verschiedene Arten von Knorpeldefekten werden unterschieden: Chondrale und osteochondrale Defekte. Chondrale Defekte penetrieren den subchondralen Knochen nicht. Aufgrund des fehlenden Anschlusses an das Knochenmark können keine knochenmark-spezifischen Zellen in den Defekt einwandern. Die durch Proteoglykane hervorgerufenen antiadhäsiven Eigenschaften des Gelenkknorpels verhindern größtenteils eine Anheftung von Zell- und Blutbestandteilen an den knorpeligen Defekträndern. Durch enzymatischen Abbau der Proteoglykane und eine lokale Behandlung mit Wachstumsfaktoren können Zellen mesenchymalen Ursprungs aus der Synovialmembran in den Defekt gelangen (Hunziker 1996). Es entsteht ein faserknorpeliges Ersatzgewebe, das im Laufe der Zeit degeneriert.

Osteochondrale Defekte penetrieren den subchondralen Knochen. Die Reparaturvorgänge bei osteochondralen Defekten sind ausgehend von tierexperimentellen Studien gut charakterisiert (Shapiro 1993, Jackson 2001). Es entsteht eine Verbindung zwischen dem subchondralen Knochenmarkraum und dem Gelenkraum. Knochenmark steigt aus dem spongiösen Knochen in den Defekt auf und gerinnt. Es bildet sich ein Fibrinnetz, in dem aus dem Knochenmark stammende undifferenzierte pluripotente mesenchymale Stammzellen und Entzündungszellen eingeschlossen sind. Die Chondrozyten aus dem anliegenden Gelenkknorpel nehmen nicht an einer Neubesiedlung des Defektes teil. Es kommt sogar zu einem Untergang von Chondrozyten im Grenzbereich zum Defekt (Hunziker 2003, Redman 2004). In den ersten Wochen überwiegen fibroblastenähnliche Zellen und Typ-I-Kollagen im Reparaturgewebe. Im weiteren Verlauf differenzieren diese Zellen unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu Chondrozyten und produzieren zunehmend Typ-II-Kollagen und andere Matrixbestandteile wie z.B. die Proteoglykane. Dieses neue Gewebe zeigt biochemische und biomechanische Eigenschaften, die sich von denen des normalen Gelenkknorpels unterscheiden. So verschiebt sich das Verhältnis von Typ-I-Kollagen zu Typ-II-Kollagen (Nehrer 1999) zugunsten von Typ-I-Kollagen. Nach etwa einem halben Jahr beginnt dieses faserknorpelige Gewebe zu degenerieren. Die Knorpeloberfläche fibrilliert, es kommt zu einem Verlust von Matrixproteinen und der subchondrale Knochen kann über sein ursprüngliches Niveau in das knorpelige Reparaturgewebe hineinwachsen (Orth 2013). Knorpelreparatur beschreibt die Bildung eines Gewebes dessen Eigenschaften dem

gesunden Gelenkknorpel ähnlich sind. Unter Knorpelregeneration wird der Ersatz von vollwertigem hyalinem Gelenkknorpel ohne das Auftreten einer faserknorpeligen Degeneration verstanden (Madry 2004).

## **2.4 Operative Therapie von Gelenkknorpeldefekten**

Die operative Therapie kann aufgrund ihres Wirkprinzips in zellbasierte und gewebsbasierte Verfahren unterschieden werden (Madry 2004, Bedi 2010, Gomoll 2010). Zellbasierte Verfahren spielen hierbei die Hauptrolle. Mit Ausnahme der Transplantation von autologen Chondrozyten findet bei allen zellbasierten Verfahren eine Eröffnung des subchondralen Raumes statt. Hierdurch gelangen mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark in den Knorpeldefekt und tragen zu dessen Neubesiedlung bei.

### **Markraumeröffnende Verfahren**

Markraumeröffnende Verfahren sind die Mikrofrakturierung, die Pridie-Bohrung und die Abrasionsarthroplastik. Gemein ist diesen 3 Ansätzen, dass durch die Verbindung zum Knochenmarkraum pluripotente mesenchymale Stammzellen den Defekt erreichen. Hierdurch bildet sich faserknorpeliges Repaturgewebe.

Bei der subchondralen Abrasionsarthroplastik werden der geschädigte Knorpel und der darunterliegende sklerosierte subchondrale Knochen bis zum Sichtbarwerden von kleinen Blutungen abgetragen (Johnson 1986, Bert 1989). Die Abrasion wird oftmals mit einem Debridement kombiniert (Johnson 2001). Es kommt jedoch nicht zu einer regenerativen Antwort des benachbarten Knorpels (Kim 1991). Stattdessen bildet sich ein faserknorpeliges Gewebe, welches im weiteren Verlauf degeneriert (Altman 1992). Die Pridie-Bohrung stellt durch das Anbohren von freiliegendem, eburnisiertem subchondralen Knochen eine Verbindung zum Knochenmarkraum her (Pridie 1959). Als Folge entsteht ein faserknorpeliges Gewebe, das pilzartig durch die Bohrkanäle wächst und im besten Falle konfluiert. Das Prinzip der Mikrofrakturierung ist eine mittels eines Pfriems ausgeführte Penetration des subchondralen Knochens (Steadman 1999, Braun 2009). Die Bildung des Ersatzknorpels ähnelt den Prinzipien bei der Pridie-Bohrung (Breinan 2000).

### **Autologe Chondrozyten-Transplantation**

Bei der autologen Chondrozyten-Transplantation werden isolierte körpereigene Knorpelzellen in umschriebene Knorpeldefekte transplantiert (Brittberg 1994, Madry 2008, Harris 2010). Diese Zellen werden in einer ersten Operation per Knorpelbiopsie aus einer weniger belasteten Zone des Gelenkknorpels gewonnen. In einer zweiten Operation werden die im Zellkulturlabor vermehrten Zellen reimplantiert. Aktuell werden biologisch abbaubare Matrices als Ersatz für den früher verwendeten Periostlappen angewendet. Hierbei wird eine mit Zellen besiedelte Trägersubstanz implantiert (Madry 2007, Lu 2010, Musumeci 2014). Jüngst wurden auch autologe adulte mesenchymale Knochenmark-Stammzellen transplantiert (Nejadnik 2010). Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Bildung eines Ersatzgewebes aus körpereigenen, isolierten Chondrozyten im Bereich der Knorpelläsion. Nachteilig sind die Notwendigkeit einer zweizeitigen Operation, damit verbundene erhöhte Operationsrisiken, eine potentielle Infektionsgefahr durch die im Labor vermehrten Zellen und relativ hohe Kosten.

### **Gewebsbasierte Verfahren**

Beim Debridement werden oberflächlich aufgefaserte Knorpelfragmente vom darunterliegenden makroskopisch intaktem Knorpel abgetragen. Auch abgelöste Knorpelteile werden entfernt. Hierbei wird oft gleichzeitig eine Lavage vorgenommen. Im Gegensatz zur Abrasion wird der subchondrale Knochen nicht ausgedünnt. Da das Debridement die Arthroseprogression nicht abwendet, wird es nicht zur alleinigen Therapie empfohlen (Moseley 2002). Die Transplantation von Knorpel-Knochen-Zylindern aus einem weniger beanspruchten Teil des Gelenks repariert den Defekt mit autologem hyalinem Knorpel (Czitrom 1986). Hierbei sind autologe osteochondrale Transplantate (Figueroa 2011), der Kondylentransfer (Imhoff 1999) sowie die Mosaikplastik (Schnettler 2008, Robert 2011) zu nennen. Bei dieser wird durch die Verwendung multipler kleiner Transplantate das Problem der Oberflächeninkongruenz verringert. Eine weitere heutzutage selten angewendete Option ist die Transplantation chondrogener Gewebe, wie Periost oder Perichondrium. Bereits 1925 wurde von Haebler beschrieben, dass Perichondrium die Reparatur von Knorpeldefekten fördern kann. Die Grundlage für diesen Therapieansatz ist die Beobachtung, dass in der Kambiumschicht von Periost und



Perichondrium zeitlebens Stammzellen vorliegen, die zu Chondrozyten differenzieren können (Nakahara 1991).

## 2.5 Wachstumsfaktoren

Lokale Wachstumsfaktoren sind ein integraler Bestandteil des physiologischen Knorpelmetabolismus. Viele werden von den Chondrozyten selbst synthetisiert und sezerniert. Aber auch systemische Hormone, wie z.B. das Wachstumshormon oder das thyreotrope Hormon beeinflussen diesen. Bei Heilungsprozessen des Gelenkknorpels spielen diese eine entscheidende Rolle und sind daher potentielle Faktoren zur Verbesserung der Knorpelreparatur (Trippel 1997, Fortier 2011).

### Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2

Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2) ist ein Teil der multifunktionellen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Familie (Gospodarowicz 1974, Burgess 1989), von denen aktuell 23 Mitglieder bekannt sind (Itoh 2011).

Das für FGF-2 kodierende Gen hat eine Länge von 56 kb und besteht aus 3 Exons und zwei Introns (Abraham 1986). Es befindet sich auf Chromosom 4 und wird in 5 mRNAs transkribiert. FGF-2 liegt in 4 Isoformen vor (Bikfalvi 1998). Eine 18 kDa FGF-2-Form, die hauptsächlich intrazytoplasmatisch und an der Zellmembran vorliegt, ist von 3 höhermolekularen Formen (21,5; 22 und 24 kDa), die zellkernnah zu finden sind, zu unterscheiden. Letztere entfalten ihre Wirkung über einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus, wohingegen die 18 kDa-Form an einen Rezeptor bindet, der Tyrosinkinaseaktivität zeigt (Jaye 1992).

Die Mitglieder der FGF-Familie spielen eine entscheidende Rolle als Signalmoleküle während der Embryogenese von Vertebraten (Gospodarowicz 1991). Vor allem die Entwicklung des Mesoderms und Neuroektoderms wird beeinflusst (Slack 1987). FGF-2 wirkt *in vitro* mitogen auf eine Vielzahl von Zellen (Gospodarowicz 1986). FGF-2 stimuliert die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten *in vivo* (Frenz 1994) und *in vitro* (Cucchiariini 2011). Auch bei der Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten (Sah 1994, Mandl 2004) sind diese Proteine wichtig. Weiterhin fördert FGF-2 die Migration von verschiedenen Zelltypen wie z.B. Endothelzellen (Kanda 2000) und mesenchymalen Stammzellen (Chuma 2004). In verschiedenen tierexperimentellen Studien bewirkte FGF-2 einen

positiven Effekt auf die Heilung von Knorpeldefekten (Jentzsch 1980, Otsuka 1997, Fujimoto 1999, Chuma 2004, Mizuta 2004, Yamamoto 2004, Maehara 2010). Fujimoto et al. zeigten anhand von osteochondralen Defekten im Kaninchenknie, dass die Applikation von FGF-2 die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten fördert und die Proliferation von bereits differenzierten Chondrozyten anregt. Nach 6 Wochen ergab sich bei der histologischen Auswertung des Reparaturgewebes anhand eines semiquantitativen Bewertungssystems eine statistisch signifikant verbesserte Heilung gegenüber der Kontrollgruppe. Durch das intraartikuläre Einbringen eines monoklonalen Antikörpers gegen FGF-2 wird hingegen der Reparaturprozess von osteochondralen Defekten negativ beeinflusst (Otsuka 1997). FGF-2 hat eine kurze Plasmahalbwertszeit von unter einer Stunde (Chuma 2004) und ist nach kurzer Zeit nicht mehr in der Synovia nachzuweisen (Shida 1996). Um einen physiologischen Effekt des Proteins zu erreichen, müssen daher entweder hohe Dosen appliziert werden (Fujimoto 1999) oder mit Hilfe von osmotischen Pumpen kontinuierliche Wirkspiegel aufrecht gehalten werden (Chuma 2004, Mizuta 2004).

Weitere Wachstumsfaktoren, wie der insulinartige Wachstumsfaktor I (IGF-I) (Nixon 1999, Fortier 2002), das knochenmorphogenetische Protein 2 (BMP-2) (Sellers 1997, 2000, Tokuhara 2010) und der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Joyce 1990, Hanada 2001, Diao 2009) zeigten ebenfalls eine positive Wirkung auf die Heilung von Knorpeldefekten und stehen im Interesse der Forschung. Ebenso kann in der Behandlung fokaler Knorpeldefekte durch kombinierten Gentransfer ein potentieller Mehrnutzen gegenüber einer Monotherapie erzielt werden (Madry 2010, Orth 2011, Shi 2013).

## 2.6 Prinzipien des Gentransfers

Gentransfer bezeichnet das Einschleusen von fremden Genen oder Gensequenzen in somatische Zellen, während Gentherapie die Behandlung von Krankheiten durch Gentransfer ist (Mulligan 1993). Voraussetzungen hierfür sind folgende Schritte. Das gewünschte Gen muss isoliert, in eine cDNS umgeschrieben und in einem Expressionsvektor kloniert werden. Vektoren sind Nukleinsäuremoleküle, die meist von Plasmiden oder Viren abgeleitet sind. Diese Vektoren bestehen typischerweise aus einer Promotor-Enhancer-Region (Rosenberg 1988), der Gensequenz und Terminationssignalen. Während des Gentransfers wird das Transfervehikel anfangs entweder an die Lipiddoppelschicht adsorbiert oder tritt mit in der Zellmembran gelegenen spezifischen Rezeptoren in Kontakt (Cotten 1990). Nachdem die DNS die Zellmembran durchquert hat, wird sie in Endosomen verkapselt. Hiernach gelangt die DNS über die Kernporen in den Zellkern und wird entweder in das Wirtsgenom integriert oder verbleibt extrachromosomal als Episom (Seisenberger 2001). Nun wird die DNS in RNS umgeschrieben und das rekombinante Protein wird synthetisiert. Dieses Protein verbleibt entweder in der Zelle oder wird sezerniert und entfaltet seine lokale und systemische Wirkung. Zum experimentellen Nachweis eines Gentransfers verwendet man Markergene, deren Produkte fluoreszieren (wie das rot fluoreszierende Protein RFP der Seeanemone *Discoma sp.*) oder durch histochemische Reaktionen (wie das  $\beta$ -Galaktosidasegen *lacZ* von *E. coli*) detektierbar sind. Transfektion wird der Gentransfer mit nicht-viralen Vektoren, Transduktion der Gentransfer mit viralen Vektoren genannt. Verschiedene physikalische, chemische und virale Transfersysteme stehen zur Verfügung. Die Gentransfereffizienz wird als Prozentsatz der Zellen ausgedrückt, die das Transgen exprimieren. Sie ist vom Zelltyp abhängig. In unserer Studie wurde das nichtliposomale Lipidgemisch FuGENE 6® benutzt (Madry 2003). Als Vorteile sind hierbei die relativ hohe Gentransfereffizienz, eine niedrige Toxizität und eine nicht zellzyklusabhängige Transfektion anzusehen. Ferner sind die Liposomen nicht immunogen und somit mehrfach anwendbar. Relativ nachteilig wirkt sich eine zellspezifische Gentransfereffizienz aus. Für Zellen des muskuloskeletalen Systems sind hohe Gentransfereffizienzen nach sorgfältiger Optimierung der Transferbedingungen erzielbar (Madry 2000).

Als Zielzellen für die Gentherapie bei osteochondralen Defekten kommen prinzipiell mesenchymale Progenitorzellen, Chondrozyten und Synoviozyten in Betracht (Cucchiaroni 2005). Eine große Schwierigkeit bei der Entwicklung von effizienten Gentransfer-Protokollen ist die eingeschränkte Erreichbarkeit der osteochondralen Defekte. Folgende experimentelle Ansätze werden hierbei verfolgt:

1. Injektion von genetisch modifizierten Zellen in das Gelenk ohne Arthrotomie
2. Arthrotomie und Transplantation von *ex vivo* genetisch modifizierten Zellen in fokale osteochondrale Gelenkknorpeldefekte
3. Arthrotomie mit direkter Einbringung von Genvektoren in die fokale Gelenkknorpeldefekte

Wir wählten die Arthrotomie und Transplantation von *ex vivo* genetisch modifizierten Zellen in Gelenkknorpeldefekte, weil diese Zellen die therapeutischen Faktoren nach der Implantation lokal im Defektareal in relativ hohen Konzentrationen sezernieren (Madry 2011). Hierdurch können lokal therapeutische Wirkspiegel erreicht und systemische Nebenwirkungen minimiert werden.

Als Trägermedium verwendeten wir Alginat. Alginat ist ein aus Braunalgen isoliertes und gereinigtes Polysaccharid (Santos 2010). Es kann zur Verkapselung einer Vielzahl von therapeutisch potentiell interessanten Zellen genutzt werden (Lim 1980, Chang 1997) und wurde bereits unter klinischen Studienbedingungen zur Transplantation von Chondrozyten beim Menschen angewendet (Almqvist 2009).

## 2.7 Eigene Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Transplantation von in Alginat verkapselten Chondrozyten, die den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 überexprimieren, in Gelenkknorpeldefekte untersucht. Es sollten folgende Fragen beantwortet werden.

1. Zeigt sich ein Unterschied in der Resorption der Alginatsphäroide zwischen Chondrozyten, die den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 oder *lacZ* überexprimieren ?
2. Welche Effekte hat die Implantation von Alginatsphäroiden, in die FGF-2-transfizierte Chondrozyten verkapselt sind, auf die Synovialmembran?
3. Führt die Implantation von Alginatsphäroiden, in die FGF-2-transfizierte Chondrozyten verkapselt sind, zu einer Verbesserung der Reparatur osteochondraler Defekten *in vivo*?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

Alle verwendeten Reagenzien stammten, sofern nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Invitrogen/GIBCO (Karlsruhe). Plastikartikel und Glasbehälter wurden von Falcon (Becton Dickinson, Pont de Claix, Frankreich) bezogen.

##### **3.1.1 Versuchstiere**

Die Versuchstieren waren 14 juvenile, weibliche Chinchilla Bastard Kaninchen (mittleres Gewicht:  $2.9 \pm 0.3$  kg) (Charles River, Sulzfeld). Die Kaninchen wurden in Käfigen bei konstanter Temperatur und einem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Wasser ad libitum sowie eine Standardernährung.

Alle Versuche wurden durch die zuständige Tierschutzkommision genehmigt und von der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes überwacht.

#### **3.2 Methoden**

##### **3.2.1 Chondrozyten, Zellkultur, Transfektion, Alginatshäroide**

Die unter 3.2.1 durchgeführten Prozeduren wurden durch Dr. rer. nat. G. Kaul durchgeführt. Der Gelenkknorpel wurde aus den Hüft- und Kniegelenken von 3 männlichen Chinchilla Bastard Kaninchen entnommen. Der Knorpel wurde zweimal mit PBS gespült, fragmentiert und mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 50 µg/ml Ascorbinsäure, 100 U/ml Penicillin G, 100 µl/ml Streptomycin und 0,02%iger Kollagenase (Biochrom, Berlin) in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 10 % CO<sub>2</sub> bei 37°C für 16 h in einem gläsernen Suspensionskulturgefäß (Bellco Biotechnology, Vineland, USA) inkubiert. Die so enzymatisch isolierten Zellen wurden durch ein Sieb (Porengröße 125 µm) filtriert. Die Vitalität der Zellen wurde durch den Trypanblauausschlusstest (Romeis 1989) nachgewiesen und erreichte durchweg über 90 %. Die Zellzahl wurde durch Hämocytoometrie bestimmt.

Nun folgte die Aussaat der Zellen in Monolayerkulturen in 100-mm Schalen, die mit einem Wachstumsmedium gefüllt waren, das DMEM und 10%iges Rinderserum

enthielt. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt und bei Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 aufgeteilt. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Akkutase (Paa Laboratories, Pasching, Österreich).

Die Transfektion erfolgte 10-14 Tage nach der Knorpelzellisolierung durch einen Endotoxin-freien Plasmidvektor (Qiagen, Hilden), der entweder das *lacZ*-Gen von *E.coli* (pCMV/*lacZ*; im folgenden *lacZ* genannt) oder die humane FGF-2-cDNS (pCMVhFGF-2, im folgenden FGF-2 genannt) unter dem Einfluss des humanen Cytomegalievirus immediate/early Promoter/Enhancer enthielt.

Als Transfersystem wurde die nichtliposomale Lipidmischung FuGENE 6® (Roche Applied Sciences, Mannheim) im Verhältnis DNS/Lipid 1:2 benutzt (Madry 2003). Die Verkapselung der Chondrozyten in Alginat (Sigma, München) erfolgte einen Tag nach der Transfektion (Madry 2003). Hierzu wurden die vorher transfizierten Chondrozyten in 1,2%igem Alginat in 0,15 M NaCl bei einer Zelldichte von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert und tropfenweise in eine 102 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Die so entstandenen Alginatsphäroide enthielten dann *lacZ* oder FGF-2 transfizierte Chondrozyten und werden im folgenden *lacZ*- oder FGF-2-Alginatsphäroide genannt.

### 3.2.2 Operation

Die Operation fand am Tag der Verkapselung der Chondrozyten in Alginat statt. Die Eingriffe erfolgten im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, durch Prof. Dr. med. H. Madry unter Assistenz von D. Arntzen. Die Narkose erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion von Rompun (0,2 ml/kg KG; Bayer, Leverkusen) und Ketavet (0,75 ml/kg KG; Pharmacia & Upjohn, Erlangen). Über einen medialen parapatellaren Zugang wurde das Kniegelenk eröffnet. Die Patella wurde nach lateral luxiert und das Knie um 90° gebeugt. Nun wurden die osteochondralen Defekte (n = 28) mit Hilfe eines handbetriebenen Bohrers (Ø 3,2 mm, Synthes, Umkirch) in der Trochlea des rechten und linken distalen Femurs der 14 Versuchstiere gesetzt. Anschließend wurden die Defekte mit PBS gespült und je ein Alginatsphäroid eingebracht. Das rechte und linke Femur erhielten abwechselnd *lacZ* bzw. FGF-2- Alginatsphäroide. Nach der Reposition der Patella wurde das Kniegelenk durchbewegt, um sich der Stabilität der Alginatsphäroide zu vergewissern. Es erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss.

Vom Tag der Operation an belasteten die Kaninchen das operierte Bein ohne Einschränkung.

### **3.2.3 Tötung der Versuchstiere**

3 (n = 7) und 14 Wochen (n = 7) nach der Transplantation der Alginatsphäroide erfolgte die Tötung der Versuchstiere durch Injektion von Pentobarbital (150 mg/kg KG; Merial, Halbergmoos). Die Kniegelenke wurden makroskopisch auf Zeichen der Synovialitis, Osteophytenbildung und anderer Reaktionen untersucht. Das Erscheinungsbild des Defektes und der artikulierenden Oberflächen wurden dokumentiert. Das distale Femur wurde entnommen, in 4%iges Formalin gegeben, getrimmt und der weiteren histologischen Aufarbeitung zugeführt.

### **3.2.4 Herstellung der histologischen Präparate**

#### **Entkalkung**

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Präparate zunächst entkalkt. Die Lösung bestand aus einer Mischung aus 50 g in 250 ml Aqua dest. gelöstem Natriumcitrat und 125 ml einer 90%igen Ameisensäure, die mit 125 ml Aqua dest. verdünnt wurde. Der Entkalkungsprozess dauerte 4 Wochen. Die Entkalkungslösung wurde jede Woche erneuert.

#### **Dehydrieren**

Zur Entwässerung der Präparate wurden diese jeweils 1 h in 70%igem, 80%igem, 95%igem und 100%igem Ethanol sowie 30 min in Xylol (je zweimal) inkubiert. Abschließend erfolgte eine Inkubation in einer Xylol-Paraffin-Mischung (1:1) für 1h.

#### **Einbettung**

Die Proben wurden für 12 h in einem Wärmeschrank bei 62°C in Paraffin inkubiert. Das Paraffin wurde anschließend zweimal gewechselt (nach je 1 h). Danach erfolgte die Einbettung der Präparate (Leica EG 1140C, Leica Instruments GmbH, Nussloch).



### **Schneiden der Präparate**

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2135) mit Einmalmikrotommesser (Leica Typ 819) geschnitten. Es wurden 5 µm starke Serienschritte angefertigt. Diese Schnitte wurden aus dem 38°C warmen Wasserbad (Leica HI 1210) auf mit APES oder Albumin beschichtete Objektträger aufgezogen. Zur Beschichtung der Objektträger mit APES wurden die Objektträger 5 min in Aceton eingetaucht, dann 5 min in 2%iges APES (4 ml APES in 196 ml Aceton) gegeben und anschließend je zweimal in Aceton und Aqua dest. getaucht. Diese Beschichtung verhinderte das Ablösen der Präparate während der folgenden Färbeschritte. Die Präparate wurden zum gleichmäßigen Glätten auf eine regulierbare Wärmeplatte gebracht und anschließend für 12 h bei 62°C in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) gelagert.

### **Färben der Schnitte**

Vor dem Färben wurden die Schnitte zweimal je 5 min zum Entparaffinieren in Xylol gegeben und durchliefen dann die absteigende Alkoholreihe. Hierbei werden die Schnitte je zweimal für 2,5 min in 100%igen und 95%igen Ethanol und einmal für 2,5 min in 80%igen Ethanol gegeben. Es wurden die folgenden histologischen Standardfärbungen durchgeführt.

#### Hämatoxylin-Eosin (HE)

Zellkerne, Kalk und saure Verbindungen werden blau, alle übrigen Strukturen in verschiedenen Tonabstufungen rot gefärbt (Romeis 1989).

Zur Herstellung der Hämatoxylinlösung wurden 10 g Hämatoxylin in 120 ml 100%igem Ethanol gelöst und bis auf 2000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Nun wurden 10 ml einer 10%igen Na-jodatlösung zugegeben. Nach 10 min gab man 200 g Aluminiumkaliumsulfat hinzu. Nach 12 h wurde die Lösung filtriert und war gebrauchsfertig. Für die 0,5%ige Eosinlösung wurden 10 g Eosin G in 2000 ml Aqua dest. gelöst. Die Schnitte wurden für 10 min in der Hämatoxylinlösung gefärbt und danach mit Wasser abgespült. Hierauf folgte die Differenzierung mit einer HCl-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte für 3 - 5 min in Leitungswasser gebläut und dann für 2 - 5 min in Eosinlösung gefärbt.

### Safranin-Orange/Echtgrün

Bindegewebe und Knochen sind intensiv grün, Knorpel leuchtend orangerot gefärbt (Rosenberg 1971, Romeis 1989).

Hierzu wurde 1 g Hämatoxylin in 100 ml 95%igem Ethanol gelöst und mit einer zweiten Lösung aus 95 ml Aqua dest., 2,48 g  $\text{FeCl}_3\text{H}_2\text{O}$  und 1 ml konzentrierter HCl zu gleichen Teilen gemischt, 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend gefiltert. Die Schnitte wurden in dieser Lösung für 2 min gefärbt und unter fließendem Wasser abgespült. Anschließend brachte man die Schnitte für 4 min in 0,02%iges Echtgrün ein (0,2 g Echtgrün in 1000 ml Aqua dest.). Nun wurden die Schnitte dreimalig in 1%igen Eisessig eingetaucht und für 30 min in Safranin-O gefärbt. Nach Abspülen unter Leitungswasser erfolgte erneut das Eintauchen in Echtgrün für 3 min. Anschließend folgte für beide Färbeprotokolle das Entwässern der Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden einmalig für 30 s in 80%igen Ethanol, dann je zweimal für 30 s in 95%igen und 100%igen Ethanol gegeben und abschließend zweimalig für 5 min in Xylol gegeben. Dann wurden die Präparate mit einem Einschlussmittel eingedeckt (Roti-Histokitt II, Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

### **Immunhistologische Färbung**

Für die immunhistologische Darstellung von Typ-I- und Typ-II-Kollagen wurde die Avidin-Biotin-Komplex(ABC)-Peroxidase Technik mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Hierzu wurde das Vectastain Elite-ABC-Kit von Vector (Vector Laboratories, Grünberg, Deutschland) verwendet.

Zuerst wurden die Schnitte für 30 min in 0,3%igem Wasserstoffperoxid gelagert. Nach einem zweimaligen 5 min langen Spülvorgang mit PBS wurden die Schnitte in 0,1%igem Trypsin für 30 min inkubiert. Auf ein erneutes zweimaliges Spülen mit PBS über 5 min folgte die Aufbewahrung in 3%igem Rinder-Serum-Albumin in PBS für 30 min. Die Schnitte wurden hieraufhin mit dem primären monoklonalen Maus Anti-Typ-I- oder Typ-II-Kollagen IgG (Acris Antibodies, Hiddenhausen) in einer 1:50-fachen Verdünnung mit PBS beschichtet und bei 4°C für 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal jeweils 5 min mit PBS gewaschen und mit dem sekundären biotin-konjugierten Anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories, Grünberg) in einer 1:500-fachen Verdünnung mit PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die

Schnitte für 30 min mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Reagenz inkubiert (Vectastain Elite-ABC-Kit, Vector Laboratories, Grünberg). Nun erfolgte wiederum ein dreifaches Spülen mit PBS. Das DAB-Chromogen wurde unter Lichtausschluss vorbereitet und sofort verwendet. Die Schnitte wurden 7 min mit Diaminobenzidin bedeckt. Abschließend wurde für eine Gesamtzeit von 5 min dreimal mit PBS gespült. Durch das Chromogen wird dort, wo die Peroxidase des ABC-Reagenz an sekundären Antikörpern haftet, eine Farbreaktion (braun) hervorgerufen. Um eine Reaktion sekundärer Immunglobuline auszuschließen, wurden Färbungen von Kontrollschnitten ausgeführt, die bis auf den primären Antikörper wie oben dargestellt behandelt wurden. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert und mit einem Einschlussmittel eingedeckt (Roti-Histokitt II, Carl Roth GmbH, Karlsruhe).

### **Synovialmembran**

Die entnommenen Synovialmembranproben wurden in Paraffin eingebettet und mit dem Rotationsmikrotom geschnitten. Die Färbung erfolgte mit der Übersichtsfärbung Hämatoxylin-Eosin.

### **3.2.5 Histologische Auswertung**

#### **Bewertungssystem der Defekte**

Anhand eines von Sellers et al. beschriebenen histologischen Bewertungssystems (Sellers 1997, Sellers 2000) wurden die mit Safranin-O-Echtgrün gefärbten Präparate beurteilt (s. Tab. 3.1). Dieses Bewertungssystem setzt sich aus folgenden Einzelparametern zusammen: Defektfüllung, Integration, Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie, Defektarchitektur, Oberflächenarchitektur, Subchondraler Knochen und *Tidemark*. Einige der Einzelparameter untersuchen den ganzen Defekt (Defektfüllung, Defektarchitektur), andere der Parameter betrachten den Knorpel separat (Matrixanfärbbarkeit, Zellmorphologie), den subchondralen Knochen (Subchondraler Knochen) oder spezielle Aspekte (Integration, Oberflächenarchitektur, *Tidemark*), sodass ein möglichst genaues und differenziertes Bild der Defektheilung entsteht. Für diese semiquantitative Bewertung der Knorpelheilung wurden Serienschnitte des distalen Femurs im Abstand von 200 µm angefertigt. Hierbei waren die Schnitte innerhalb eines Abstandes von maximal 1 mm

vom Zentrum des Defekts entfernt. Pro Knie wurden jeweils 9-10 Schnitte von 3 voneinander unabhängigen Untersuchern beurteilt. Die Ergebnisse wurden pro Präparat und Kriterium gemittelt und ausgewertet. Insgesamt wurden 274 Schnitte von jedem Untersucher betrachtet. Die Therapieform war den Untersuchern dabei nicht bekannt. Die einzelnen Parameter des Bewertungssystems wurden addiert. Auf diese Weise wurden für jeden Defekt Gesamtwerte zwischen 0 (leerer Defekt ohne jegliches Reparaturgewebe) und 31 Punkten (normaler Gelenkknorpel, vollständige Regeneration) bestimmt.

1. Defektfüllung		Punkte
in Relation zum angrenzenden gesunden Knorpel	111 – 125 %	1
	91 – 110 %	0
	76 – 90 %	1
	51 – 75 %	2
	26 – 50 %	3
	< 25 %	4
2. Integration		
des Reparaturgewebes mit dem angrenzenden gesunden Knorpel	normale Kontinuität	0
	verminderte Zellularität	1
	Spalte auf einer Seite	2
	Spalte auf beiden Seiten	3
3. Matrixanfärbbarkeit		
mit Safranin-O	Normal	0
	leicht vermindert	1
	mittelstark vermindert	2
	stark vermindert	3
	keine Anfärbbarkeit	4
4. Zellmorphologie		
(a) normal		0
(b) vorwiegend runde Zellen mit Chondrozytenmorphologie	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	0
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	1
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
(c) 50 % runde Zellen mit Chondrozytenmorphologie	75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	2
	25 – 75 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	3
	< 25 % der Zellen in Säulen in der radialen Zone	4
(d) vorwiegend Fibroblasten-ähnliche Zellen		5
5. Defektarchitektur		
ohne Berücksichtigung der Defektränder	Normal	0
	1 – 3 kleine Defekte	1
	1 – 3 große Defekte	2
	> 3 große Defekte	3
	Risse	4
6. Oberflächenarchitektur		
Fibrillation = Auffaserung der Oberfläche	Normal	0
	leichte Fibrillationen	1
	mittelstarke Fibrillationen	2
	starke Fibrillationen	3
7. Subchondraler Knochen		
neugebildet unterhalb des Knorpelreparaturgewebes	91 – 100 %	0
	76 – 89 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4
8. Tidemark		
= Grenze zwischen kalzifiziertem und hyalinem Gelenkknorpel	Vollständig	0
	75 – 99 %	1
	50 – 74 %	2
	25 – 49 %	3
	< 25 %	4

Tab. 3.1: Bewertungssystem der Knorpelreparatur nach Sellers (1997).

### Synovialmembran

Die Synovialmembran wurde anhand eines etablierten histologischen Bewertungssystems beurteilt (Nixon 1999, Fortier 2002). Die Kategorien des Bewertungssystems beinhalten Villus-Fibrosierung, Villus-Architektur und Vorhandensein eines entzündlichen Infiltrates (s. Tab. 3.2). Es wurden jeweils 5 mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Präparate von zwei unabhängigen Untersuchern beurteilt.

1. Villus-Fibrosierung	Punkte
Normal	0
Leicht	1
Mittelstark	2
Stark	3
2. Villusarchitektur	
Normal	0
Leichte Verklumpung	1
Mittelstarke Verklumpung	2
Starke Verklumpung	3
3. Entzündliches Zellinfiltrat	
Normal (kein Infiltrat)	0
Leicht	1
Mittelstark	2
Stark	3

Tab 3.2: Synovialmembran-Bewertungssystem nach Fortier (2002).

### Immunhistochemische Auswertung

Die Immunreaktivität auf Typ-I- und Typ-II-Kollagen im Reparaturgewebe beurteilten wir mit Hilfe eines semiquantitativen Bewertungssystems. Hierbei diente die Intensität der Braunverfärbung als Indikator der Kollagendichte. Bei der Anfärbung von Typ-I-Kollagen fungierte der subchondrale Knochen als Positivkontrolle und der normale Gelenkknorpel als Negativkontrolle. Bei der Anfärbung von Typ-II-Kollagen wurde umgekehrt verfahren. Die Immunreaktivität bewerteten wir wie folgt: (-) keine Immunreaktivität, (+) schwächere Immunreaktivität, (++) gleiche Immunreaktivität, (+++) stärkere Immunreaktivität als in der Positivkontrolle. Von jedem Kniegelenk wurden 10 Schnitte bei 20- und 40-facher Vergrößerung von einem Untersucher verblindet evaluiert.

### **3.2.6 Histomorphometrische Auswertung**

Mittels eines BX-45 Lichtmikroskopes (Olympus, Hamburg), das über eine CC-12 Kamera (Soft Imaging System, Münster) mit einem Computer verbunden war, wurden die angefertigten Präparate beurteilt. Die digitalisierten Bilder konnten mittels der auf dem Computer installierten Bildanalysesoftware analySIS (Soft Imaging System) untersucht werden.

#### **Bestimmung der Alginatfläche**

Die von den Alginatsphäroiden eingenommene Fläche wurde an Hämatoxylin-Eosin und Safranin-O-Echtgrün gefärbten Schnitten gemessen. Es wurden Serienschnitte des distalen Femurs im Abstand von 200 µm verwendet. Die Schnitte waren innerhalb eines Abstandes von maximal 1 mm vom Zentrum des Defekts entfernt und pro Defekt wurden 3 – 5 Schnitte vermessen, anschließend wurde ein Mittelwert gebildet. Nach der Digitalisierung der Schnittbilder wurde durch das Umfahren der Grenzen des Alginatsphäroids durch einen verblindeten Untersucher über das Programm analySIS dessen Fläche bestimmt. Die Vergrößerung wurde hierbei der Alginatfläche angepasst, um ein möglichst genaue Bestimmung der Alginatfläche zu erreichen.

#### **Bestimmung der prozentualen Defektfüllung**

Per Bildanalyse mittels der Software wurden 3 Parameter zur quantitativen Beurteilung der Knorpelheilung bestimmt.

1. Prozentuale Defektfüllung mit Safranin-O-positivem Gewebe
2. Prozentuale Defektfüllung an gesamtem Reparaturgewebe
3. Prozentualer Anteil des über das Niveau einer hundertprozentigen Füllung des Defekts hinausgehenden Gewebes

Diese Parameter wurden an Safranin-O-Echtgrün gefärbten Präparaten bestimmt. Es wurden Serienschnitte des distalen Femurs im Abstand von 200 µm verwendet. Die Schnitte waren innerhalb eines Abstandes von maximal 1 mm vom Zentrum des Defekts entfernt. Pro Defekt wurden jeweils 5 Schnitte beurteilt. Zunächst wurden für alle Präparate identische Mikroskop- und Kameraeinstellungen gewählt. Mit Hilfe der

Computersoftware wurde ein Bild des Defektes erstellt, an dem die folgenden Messungen vorgenommen wurden.

Zuerst wurde die Fläche bestimmt, die bei einer vollständigen Reparatur des Defektes im ursprünglich mit hyalinem Knorpel überzogenen Bereich des Defektes zu erwarten wäre. Diese Fläche wird im Folgenden als Referenzfläche bezeichnet und entspricht einer theoretischen hundertprozentigen Füllung des Defekts. Nun wurde innerhalb dieser Referenzfläche die Fläche des gesamten Reparaturgewebes bestimmt. Hierin enthalten waren z.B. Knorpel, Knochen, undifferenziertes mesenchymales Gewebe. Innerhalb des Reparaturgewebes wurde die Fläche des in der Safranin-O-Echtgrün-Färbung orangerot gefärbten Knorpels vermessen. Dieser wurde als Safranin-O-positiver Knorpel bezeichnet. Bei den letzten beiden Parametern wurde über das Niveau der Referenzfläche hinausgehendes Gewebe nicht berücksichtigt. Außerdem wurde noch die Fläche des Gewebes bestimmt, das über das Niveau der Referenzfläche hinausragt. Dies wurde als hypertrophes Gewebe bezeichnet.

Anhand dieser 4 bestimmten Parameter wurden 3 Quotienten bestimmt und zwischen den Gruppen verglichen.

1. Safranin-O-positiver Knorpel/Referenzfläche
2. Reparaturgewebe/Referenzfläche
3. Hypertrophes Gewebe/Referenzfläche

### **Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils 3 Safranin-O-Echtgrün gefärbte Schnitte pro Defekt verwendet. Um die Zellzahl möglichst genau bestimmen zu können, wurde ein Bild in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Auf diesem auf dem Computerbildschirm erscheinenden Ausschnitt wurden alle Zellen gezählt bei denen ein Zellkern zu erkennen war (Ausnahme: Kapillarendothelzellen und Entzündungszellen). Pro Schnitt wurden die Zellkerne in 5 standardisierten Bereichen des Defektes ausgezählt.



### **3.2.7 Statistische Auswertung**

Die Experimente wurden mit 7 Defekten pro Gruppe und Zeitpunkt ausgeführt. Um die Anzahl der Versuchstiere zu bestimmen, wurde eine Standardabweichung von 25 % auf den Mittelwert des histologischen Bewertungssystems anhand der vorliegenden Literatur veranschlagt (Orth 2013). Um eine Teststärke von 80 % ( $\beta = 0,8$ ) und ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 zu erreichen, wäre eine Anzahl von 6 Versuchstieren ausreichend gewesen um eine Differenz von 5 Punkten zwischen den Gruppen zu detektieren. Ein p-Wert von 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse der histomorphometrischen Untersuchungen (Zellzahl, Alginatfläche, prozentuale Defektfüllung) sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte mittels ANOVA (analysis of variance).

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (Version 12.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Die statistische Auswertung der histologischen Bewertungssysteme wurde von D. Zurakowski, Ph.D., Department of Biostatistics, Harvard University (Boston, MA, USA) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Alginatfläche im Reparaturgewebe

Nach 3 Wochen *in vivo* waren sowohl die *lacZ*- als auch die FGF-2-Alginatsphäroide von einem Resorptionsgewebe umgeben und infiltriert. Dieses Gewebe bestand aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen, Histiozyten und Lymphozyten (siehe Abb. 4.1 A, B). Das Ausmaß dieser entzündlichen Reaktion variierte interindividuell. Es zeigten sich teils Fissuren in den Alginatsphäroiden und an deren Rändern. Die Chondrozyten hatten vorwiegend eine sphäroide Form, die im Wesentlichen der Form der Chondrozyten in der Transitionalzone des angrenzenden gesunden Knorpels entsprach. FGF-2 wurde von den FGF-2-transfizierten Chondrozyten exprimiert (siehe Abb. 4.1 F). Die von den *lacZ*- und den FGF-2-Alginatsphäroiden eingenommene Fläche betrug  $1,62 \pm 1,23$  und  $1,14 \pm 0,63$  mm<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ,  $n = 7$ ).

Nach 14 Wochen fanden sich nur noch Reste des Alginats im Defekt (siehe Abb. 4.1 C, D). Im Bereich der Alginatsphäroide hatte sich größtenteils subchondraler Knochen gebildet. Die Überreste der Alginatsphäroide waren von einem Gewebe umgeben, das aus Fibroblasten und Lymphozyten bestand. Die von den *lacZ*- und den FGF-2-Alginatsphäroiden eingenommene Fläche betrug  $0,03 \pm 0,05$  und  $0,08 \pm 0,13$  mm<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ,  $n = 7$ ). Dies entspricht 3 bzw. 7 % des nach 3 Wochen verbliebenen Alginats. Die Alginatsphäroide wurden zwischen den beiden Zeitpunkten zu einem großen Teil resorbiert, reflektiert in der signifikanten Verminderung der Alginatfläche nach 3 bzw. 14 Wochen ( $p < 0,0001$ ). Nach 3 Wochen (*lacZ*- und FGF-2-Gruppe zusammen) ergab sich eine Alginatfläche von  $1,40 \pm 1,37$  mm<sup>2</sup>, wohingegen dieser Wert nach 14 Wochen (*lacZ*- und FGF-2-Gruppe zusammen) bei  $0,05 \pm 0,06$  mm<sup>2</sup> lag.

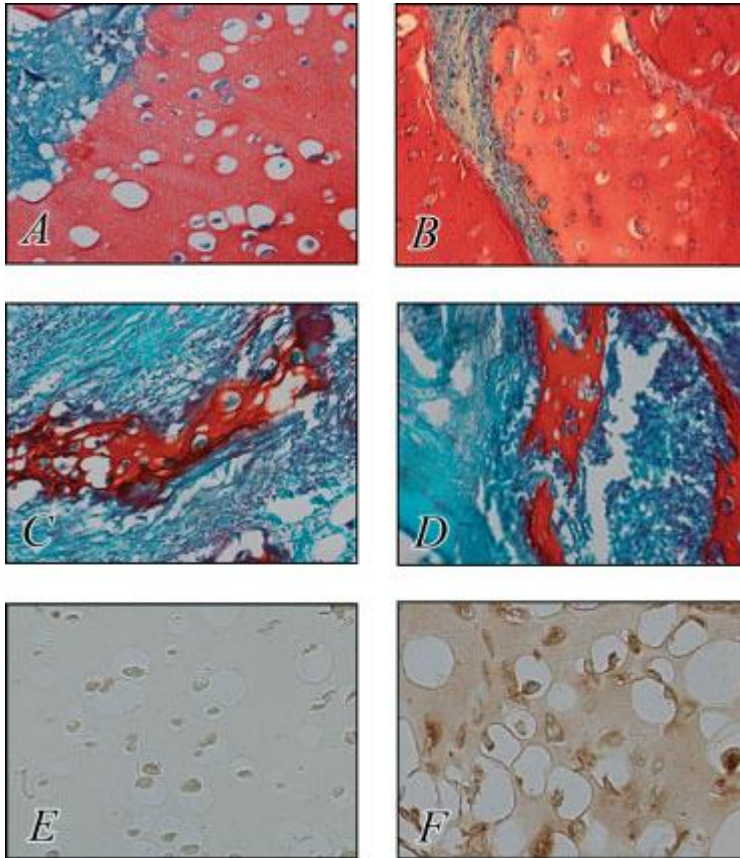


Abb. 4.1: Histologische Darstellung der Alginatsphäroide.  
Repräsentative histologische Präparate der *lacZ*- (A,C,E) und der FGF-2-Gruppe (B,D,F) nach 3 (A,B,E,F) und 14 (C,D) Wochen. Färbung nach Safranin-O-Echtgrün (A-D) und immunhistochemisch per monoklonalem Maus anti-humanem FGF-2-IgG. Vergrößerung 200- (A-D) und 250-fach (E,F).

## 4.2 Synovialmembran-Bewertungssystem

Die Effekte der lokalen Überexpression von rekombinanten humanen FGF-2 auf die Synovialmembran wurden anhand eines publizierten Bewertungssystems ausgewertet (Nixon 1999, Fortier 2002) (Tab. 4.5 und 4.6).

In allen 3 Kategorien kam es nur zu diskreten Veränderungen der Synovialmembran. Zeichen der Synovialitis fanden sich nicht. Für keine der Kategorien oder für den Gesamtwert ergab sich nach 3 bzw. 14 Wochen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen *lacZ*- und FGF-2-Gruppe ( $p > 0,05$  zu beiden Zeitpunkten,  $n = 7$ ).

Kategorie	<i>lacZ</i>	FGF-2	p-Wert
Villus-Fibrosierung	$0.14 \pm 0.36$	$0.14 \pm 0.36$	$> 0.05$
Villus-Architektur	$0.29 \pm 0.49$	$0.21 \pm 0.43$	$> 0.05$
Entzündliches Zellinfiltrat	$0.00 \pm 0.00$	$0.14 \pm 0.36$	$> 0.05$
<b>Gesamtpunktwert</b>	<b><math>0.43 \pm 0.14</math></b>	<b><math>0.50 \pm 0.04</math></b>	<b><math>&gt; 0.05</math></b>

Tab. 4.1: Synovialmembran-Bewertungssystem nach 3 Wochen.

Kategorie	<i>lacZ</i>	FGF-2	p-Wert
Villus-Fibrosierung	$0.43 \pm 0.50$	$0.46 \pm 0.51$	$> 0.05$
Villus-Architektur	$0.29 \pm 0.46$	$0.25 \pm 0.44$	$> 0.05$
Entzündliches Zellinfiltrat	$0.11 \pm 0.31$	$0.14 \pm 0.36$	$> 0.05$
<b>Gesamtpunktwert</b>	<b><math>0.82 \pm 0.16</math></b>	<b><math>0.86 \pm 0.16</math></b>	<b><math>&gt; 0.05</math></b>

Tab. 4.2: Synovialmembran-Bewertungssystem nach 14 Wochen.

### 4.3 Strukturelle Knorpelreparatur nach 3 und 14 Wochen

Bei der Explantation der Kniegelenke zeigten sich zu beiden Zeitpunkten keine makroskopischen Zeichen einer Synovialitis, eines Hämatoms oder einer Osteophytenbildung. Das Reparaturgewebe hatte eine weiß-gräuliche Farbe, ließ sich immer vom angrenzenden gesunden Knorpel abgrenzen und war nicht erhaben. Um die Effekte der FGF-2 Überexpression auf die Gelenkknorpelheilung *in vivo* zu beurteilen, wurde das histologische Bewertungssystem nach Sellers verwendet, das sich aus 8 Einzelparametern zusammensetzt.

Die Alginatsphäroide verblieben nach 3 Wochen in ihrer subchondralen Lokalisation und sind im unteren Teil der Abbildung zu sehen (Abb. 4.2 A, B). Eine Resorption hatte bereits eingesetzt. Nach 14 Wochen waren in den dargestellten Schnitten keine Alginatüberreste mehr zu erkennen (Abb. 4.3 A, B). Der mit FGF-2 behandelte Defekt zeigte nach 3 Wochen eine bessere Defektfüllung (Abb. 4.2 A). In den mit *lacZ*-transfizierten Zellen behandelten Defekten zeigten die Zellen ein mehr spindelförmiges Aussehen als Zeichen eines bindegewebsartigen Reparaturgewebes (Abb. 4.2 C, E). Die Oberfläche erschien teils aufgefasert (Abb. 4.2 G). Im Gegensatz hierzu fanden sich in den mit FGF-2-behandelten Defekten runde Zellen mit runden Zellkernen, die viele morphologische Charakteristika von Chondrozyten aufwiesen (Abb. 4.2 D, F). Eine Immunreaktivität auf Typ-II-Kollagen war in den mit FGF-2 behandelten Defekten schon zu sehen (Abb. 4.2 H). Ferner war eine intensivere Anfärbbarkeit des Knorpels mit Safranin-O-Echtgrün zu erkennen als ein Hinweis auf einen höheren Proteoglykangehalt (Abb. 4.2 B, D).

Nach 14 Wochen war die Anfärbbarkeit in den mit FGF-2 behandelten Defekten (Abb. 4.3 B, D) verstärkt im Vergleich mit den mit *lacZ* behandelten Defekten (Abb. 4.3 A, C). In beiden Gruppen fand sich eine nahezu vollständige Ausfüllung des Defekts mit Reparaturgewebe (Abb. 4.3 A, B). Der mit *lacZ* behandelte Defekt ließ insbesondere am linken Bildrand eine eingeschränkte Integration zum angrenzenden gesunden Gelenkknorpel erkennen (Abb. 4.3 A). Die Zellen in beiden Gruppen zeigten eine runde Form sowie runde Zellkerne (Abb. 4.3 C-F). Allerdings zeigte sich nur in den mit FGF-2 behandelten Defekten teils eine Anordnung in für den hyalinen Knorpel typischen Säulen (Abb. 4.3 D, F). Auch ließ sich eine Neubildung der *Tidemark* erkennen. Die Immunreaktivität auf Typ-II-Kollagen war im Reparaturgewebe in den *lacZ*-behandelten Defekten (Abb. 4.3 I) herabgesetzt.

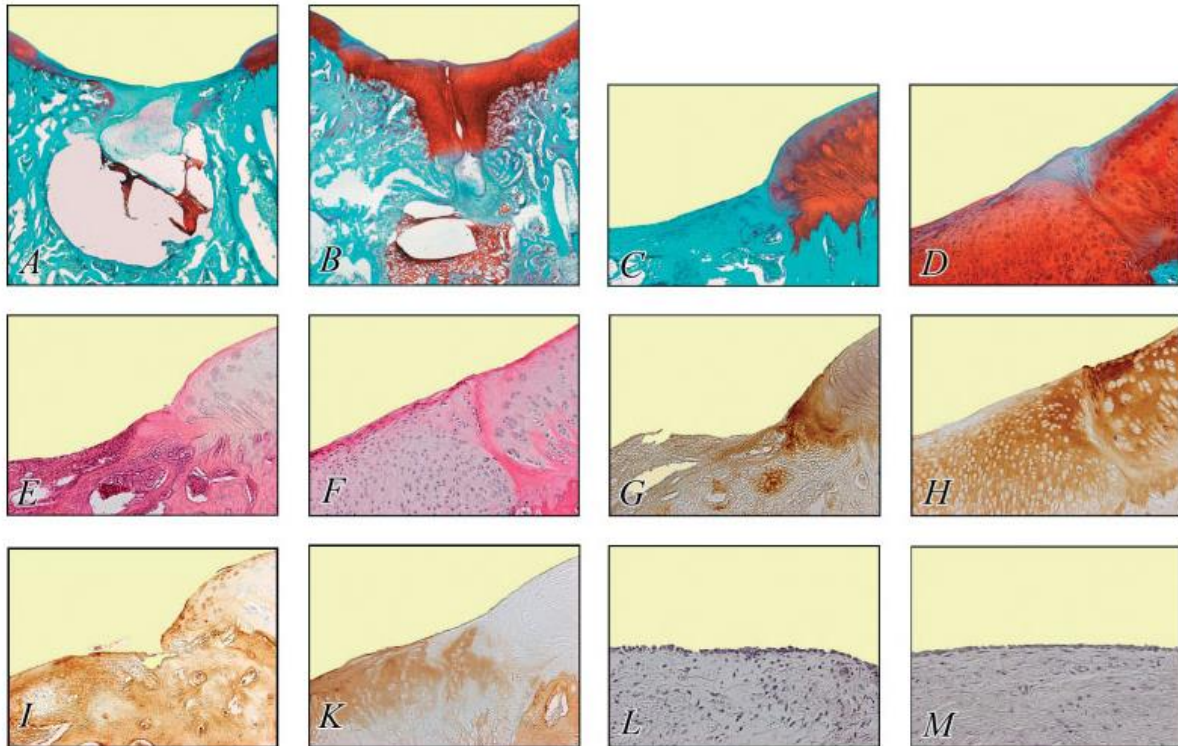


Abb. 4.2: Histologische Bilder des Reparaturgewebes nach 3 Wochen.

Die Bilder A, C, E, G, und I entsprechen *lacZ*, die Bilder B, D, F, H und K FGF-2 behandelten osteochondralen Defekten. Die Bilder A-D sind mit Safranin-O-Echtgrün gefärbt, die Bilder E, F, L und M mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Die Bilder G und H wurden per Immunhistochemie mit einem monoklonalen Maus anti-humanen Typ-II-Kollagen-Antikörper gefärbt. Die Bilder I und K wurden per Immunhistochemie mit einem monoklonalen Maus anti-humanen Typ-I-Kollagen-Antikörper gefärbt. Die Bilder L und M zeigen die den osteochondralen Defekten angrenzende Synovialmembran in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). Bei den Bilder C und D handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Bilder A und B. Die Vergrößerung ist 40- (A, B) bzw. 100-fach (C-M). Die gezeigten Schnitte entsprechen Defekten, deren histologischer Punktwert dem Mittelwert ihrer Gruppe entspricht.

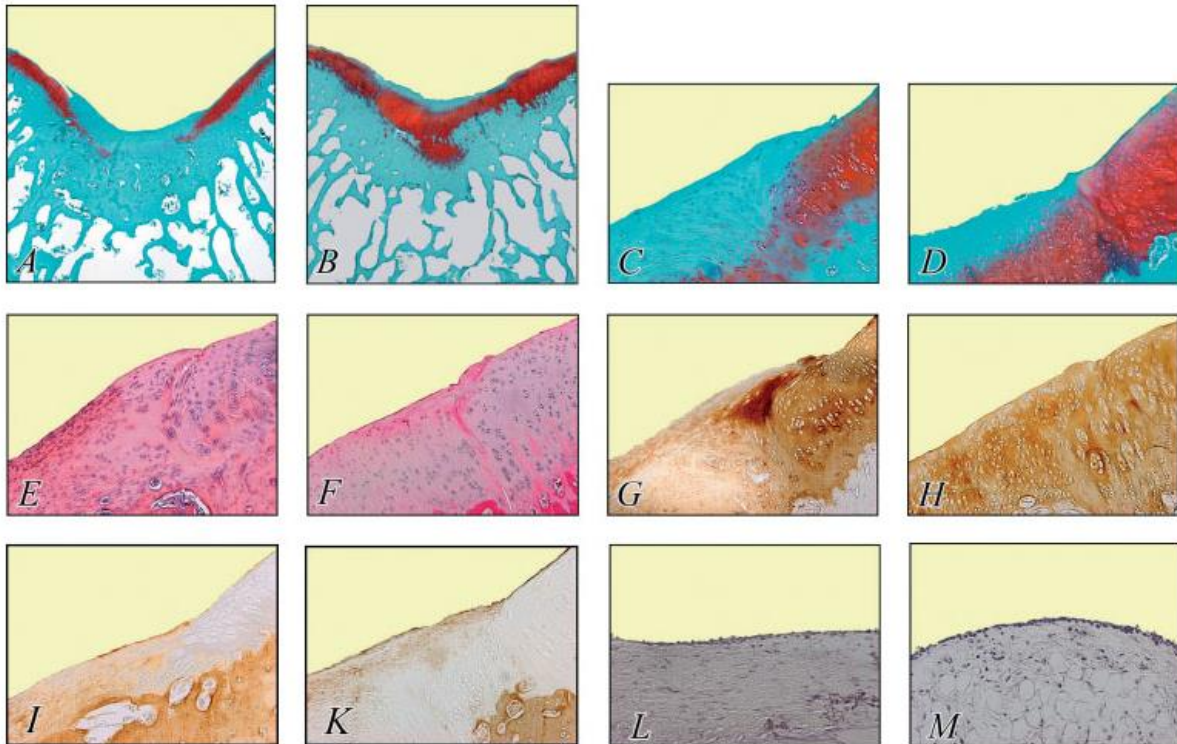


Abb. 4.3: Histologische Bilder des Reparaturgewebes nach 14 Wochen.

Die Bilder A, C, E, G, und I entsprechen *lacZ*, die Bilder B, D, F, H und K FGF-2 behandelten osteochondralen Defekten. Die Bilder A-D sind mit Safranin-O-Echtgrün gefärbt, die Bilder E, F, L und M mit Hämatoxylin-Eosin (HE). Die Bilder G und H wurden per Immunhistochemie mit einem monoklonalen Maus anti-humanen Typ-II-Kollagen-Antikörper gefärbt. Die Bilder I und K wurden per Immunhistochemie mit einem monoklonalen Maus anti-humanen Typ-I-Kollagen-Antikörper gefärbt. Die Bilder L und M zeigen die den osteochondralen Defekten angrenzende Synovialmembran in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE). Bei den Bilder C und D handelt es sich um Ausschnittsvergrößerungen der Bilder A und B. Die Vergrößerung ist 40- (A, B) bzw. 100-fach (C-M).

Zuerst wurde die Entwicklung der Knorpelheilung anhand der *lacZ*-Gruppe untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse des histologischen Bewertungssystems nach 3 und 14 Wochen. Nach 14 Wochen zeigte sich eine statistisch signifikant verbesserte Heilung für die Parameter Defektfüllung ( $p < 0,01$ ), Defektarchitektur ( $p < 0,05$ ) und Gesamtpunktwert ( $p < 0,01$ ). Anhand dieser Daten lässt sich das Fortschreiten des Reparaturprozesses ersehen. Gleichzeitig fanden sich Zeichen der Degeneration des neu gebildeten Gewebes, erkennbar an den höheren (schlechteren) Punktwerten für die Parameter Oberflächenarchitektur und die Formation der *Tidemark* nach 14 Wochen verglichen mit der 3 Wochengruppe. Im Folgenden wurde die Reparatur von Defekten verglichen, welche entweder mit *lacZ*- oder FGF-2-Alginatsphäroiden behandelt wurden. Zu keinem der Zeitpunkte



fand sich in einer der Gruppen eine vollständige Regeneration des Knorpels (0 Punkte). Nach 3 Wochen waren die Defekte in der FGF-2-Gruppe deutlich mehr gefüllt als die der *lacZ*-Gruppe und das Reparaturgewebe reichte fast bis zum Niveau des angrenzenden gesunden Knorpels. Dies zeigte sich am besten Einzelwert für eine Kategorie (0,77), was einem 2,6-fach besseren Wert als in der *lacZ*-Gruppe entspricht ( $p < 0,01$ ). In der Kategorie Defektarchitektur fand sich mit einem 1,3-fach besseren Wert in der FGF-2-Gruppe ein ähnliches Ergebnis ( $p < 0,01$ ). Auch in allen anderen Kategorien zeigten sich bessere Einzelwerte in der FGF-2-Gruppe, allerdings ohne statistische Signifikanz. Der sich aus der Addition der Einzelwerte der Kategorien ergebende Gesamtpunktwert betrug in der *lacZ*-Gruppe 19,1 und in der FGF-2-Gruppe 15,2 ( $p < 0,01$ ).

	<i>lacZ</i>	FGF-2	
Kategorie	Mittelwert (95% KI)	Mittelwert (95% KI)	p-Wert
Defektfüllung	2.00 (0.83 – 3.17)	0.77 (0.27 – 1.27)	<0.01
Integration	1.50 (0.81 – 2.19)	1.41 (1.02 – 1.81)	0.25
Matrix-Anfärbbarkeit	2.91 (2.51 – 3.32)	2.14 (0.79 – 3.50)	0.07
Zellmorphologie	2.96 (2.00 – 3.91)	2.29 (1.59 – 2.98)	0.12
Defektarchitektur	2.16 (1.27 – 3.04)	1.67 (1.20 – 2.15)	<0.01
Oberflächenarchitektur	1.64 (0.79 – 2.50)	1.52 (1.11 – 1.95)	0.47
Subchondraler Knochen	2.23 (0.96 – 3.50)	1.83 (1.03 – 2.63)	0.59
<i>Tidemark</i>	3.84 (3.56 – 4.12)	3.54 (2.79 – 4.29)	0.11
<b>Gesamtpunktwert</b>	<b>19.1 (15.6 – 22.6)</b>	<b>15.2 (11.6 – 18.8)</b>	<b>&lt;0.01</b>

Tab. 4.3: Defekt-Bewertungssystem nach 3 Wochen.

Nach 14 Wochen war die Morphologie der Zellen des Reparaturgewebes der FGF-2-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 1,9-fach verbessert ( $p < 0,01$ ). Die Zellen in dem neu gebildeten Gewebe waren vorwiegend sphäroid und - für den hyalinen Knorpel typisch - teilweise in Säulen angeordnet. Auffällig ist der 1,6-fach verbesserte Wert der FGF-2-Gruppe gegenüber der 3 Wochen FGF-2-Gruppe, während sich die *lacZ*-Gruppe nur 1,1-fach verbesserte ( $p > 0,05$ ). Auch die Formation der *Tidemark* lief in den FGF-2-Defekten beschleunigt ab. Hier zeigte sich



in der *lacZ*-Gruppe der schlechteste Einzelwert für eine Kategorie zu beiden Zeitpunkten, während sich der Wert für die FGF-2-Gruppe von 3,54 auf 3,30 leicht verbesserte. Auch in allen anderen Kategorien zeigten sich in der FGF-2-Gruppe im Vergleich zur *lacZ*-Gruppe bessere Werte ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Der Wert für den Parameter Defektfüllung lag in der FGF-2-Gruppe bei 0,11. Dies entspricht einer nahezu hundertprozentigen Defektfüllung und weiteren Verbesserung gegenüber der 3 Wochengruppe. Wie in der 3 Wochengruppe handelte es sich um den besten Einzelwert für eine Kategorie. Auch in der *lacZ*-Gruppe lag eine sehr gute Defektfüllung mit einem Wert von 0,48 und eine deutliche Verbesserung gegenüber der 3 Wochengruppe vor. Nach 3 Wochen zeigte sich für diesen Parameter eine statistische Signifikanz, nach 14 Wochen nicht mehr ( $p = 0,08$ ). Wie in der 3 Wochengruppe war der Gesamtpunktwert in der FGF-2-Gruppe niedriger als in der *lacZ*-Gruppe (11,1 versus 15,8;  $p < 0,01$ ).

	<i>lacZ</i>	FGF-2	
Kategorie	Mittelwert (95% KI)	Mittelwert (95% KI)	p-Wert
Defektfüllung	0.48 (0.09 – 0.87)	0.11 (0.01 – 0.38)	0.08
Integration	1.33 (0.68 – 1.98)	1.18 (0.95 – 1.42)	0.61
Matrix-Anfärbbarkeit	2.52 (1.63 – 3.41)	1.52 (0.72 – 2.33)	0.07
Zellmorphologie	2.60 (1.82 – 3.38)	1.40 (1.04 – 1.76)	<0.01
Defektarchitektur	1.60 (0.90 – 2.30)	1.18 (0.76 – 1.61)	0.24
Oberflächenarchitektur	1.89 (1.30 – 2.48)	1.57 (1.17 – 1.97)	0.29
Subchondraler Knochen	1.13 (0.63 – 1.63)	0.84 (0.21 – 1.46)	0.39
<i>Tidemark</i>	4.00 (4.00 – 4.00)	3.30 (2.79 – 3.81)	<0.01
<b>Gesamtpunktwert</b>	<b>15.8 (13.3 – 18.2)</b>	<b>11.1 (8.9 – 13.2)</b>	<b>&lt;0.01</b>

Tab. 4.4: Defekt-Bewertungssystem nach 14 Wochen.

#### 4.4 Quantifizierung individueller Parameter des Reparaturgewebes

Mittels computergestützter Bildanalyse wurde die prozentuale Defektfüllung des Reparaturgewebes mit Safranin-O-positivem-Gewebe sowie hypertrophes Gewebe gemessen.

##### 4.4.1 Prozentualer Anteil an Safranin-O-positivem Reparaturgewebe

Nach 3 Wochen waren in der *lacZ*- und FGF-2-Gruppe  $16,3 \pm 15,5$  % bzw.  $46,3 \pm 40,0$  % ( $p > 0,05$ ) des Reparaturgewebes mit Safranin-O-positivem Gewebe gefüllt. Obwohl die Fläche an Safranin-O-positivem Gewebe in der FGF-2-Gruppe 2,8-fach höher war als in der Kontrollgruppe, wurde aufgrund der großen interindividuellen Variabilität keine statistische Signifikanz erreicht ( $p = 0,09$ ). Die Ergebnisse variierten in der *lacZ*-Gruppe von 3,0 % bis 47,5 % und in der FGF-2-Gruppe von 5,1 % bis 99,8 %. Eine große Differenz zeigte sich vor allem bei den Versuchstieren 3 (13,1 % in der *lacZ*-Gruppe, 99,8 % in der FGF-2-Gruppe) und 5 (14,4 % in der *lacZ*-Gruppe, 91,4 % in der FGF-2-Gruppe). Bei den Versuchstieren 4, 6 und 7 zeigte sich in beiden Gruppen eine spärliche Füllung (unter 20 %). In der FGF-2-Gruppe war im Mittel fast dreimal soviel Safranin-O-positives Gewebe zu finden wie in der *lacZ*-Gruppe. In 6 der 7 Paare waren die Defekte der FGF-2-Gruppe mit mehr Safranin-O-positivem Gewebe aufgefüllt.

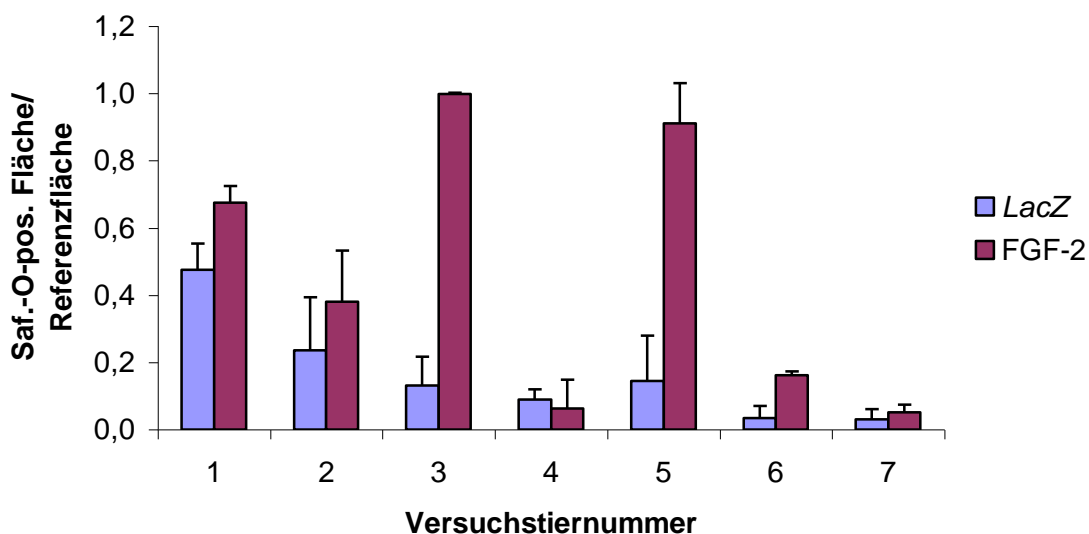


Diagramm 4.1: Defektfüllung mit Safranin-O-pos. Gewebe nach 3 Wochen.

Nach 14 Wochen zeigte sich ein ähnliches Bild. Der Mittelwert der *lacZ*-Gruppe lag bei  $32,4 \pm 30,7$  % und in der FGF-2-Gruppe bei  $57,0 \pm 18,2$  % ( $p > 0,05$ ). Die Ergebnisse variierten in der *lacZ*-Gruppe von 2,9 % bis 72,1 % und in der FGF-2-Gruppe von 19,8 % bis 72,0 %. Bei den Versuchstieren 9 (2,9 % vs. 54,1 %), 10 (6,4 % vs. 70,4 %) und 14 (12,0 % vs. 66,6 %) fand sich in der FGF-2-Gruppe eine deutlich bessere Füllung des Defekts. Lediglich bei einem Versuchstier in der FGF-2-Gruppe konnte man einen nicht bis zur Hälfte mit Safranin-O-positivem Gewebe gefüllten Defekt erkennen. In der *lacZ*-Gruppe war dies bei 4 Versuchstieren der Fall. Wie nach 3 Wochen fand sich in 6 der 7 Paare in der FGF-Gruppe mehr Safranin-O-positives Gewebe.

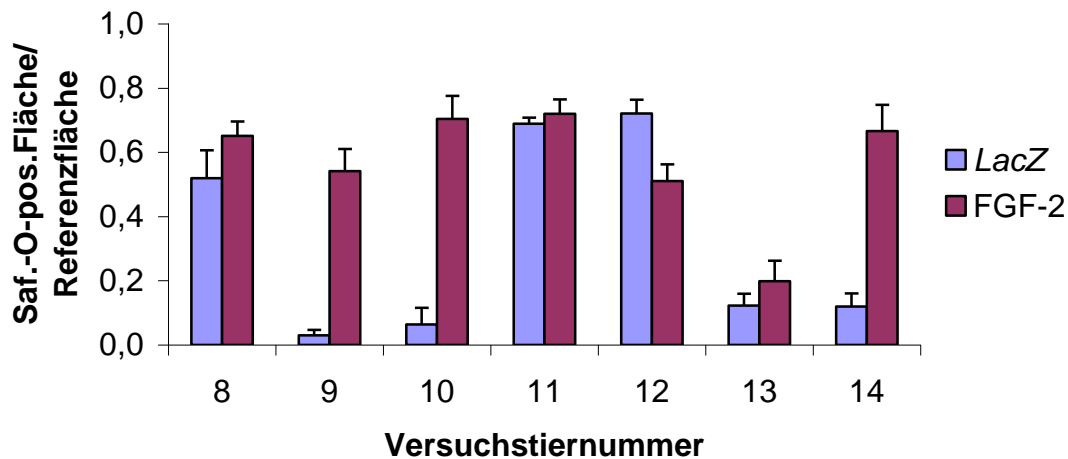


Diagramm 4.2: Defektfüllung mit Safranin-O-pos. Gewebe nach 14 Wochen.

#### 4.4.2 Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe

Nach 3 Wochen waren bei 5 Versuchstieren in der FGF-2-Gruppe die Defekte besser gefüllt, wobei der Mittelwert  $58,4 \% \pm 20,7 \%$  für die *lacZ*-Gruppe und  $73,7 \% \pm 23,8 \%$  für die FGF-2-Gruppe betrug. Dies entspricht einer 1,3-fachen besseren Defektfüllung ( $p > 0,05$ ). Auffällig war die nahezu vollständige Auffüllung der Defekte mit Reparaturgewebe nach 14 Wochen mit nahezu gleichen Werten für die *lacZ*- ( $96,3 \% \pm 5,0 \%$ ) und FGF-2-Gruppe ( $96,4 \% \pm 4,0 \%$ ). Es zeigte sich ein statisch signifikantes Ergebnis zwischen den beiden Zeitpunkten ( $p < 0,001$ ). Zu beiden Zeitpunkten fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

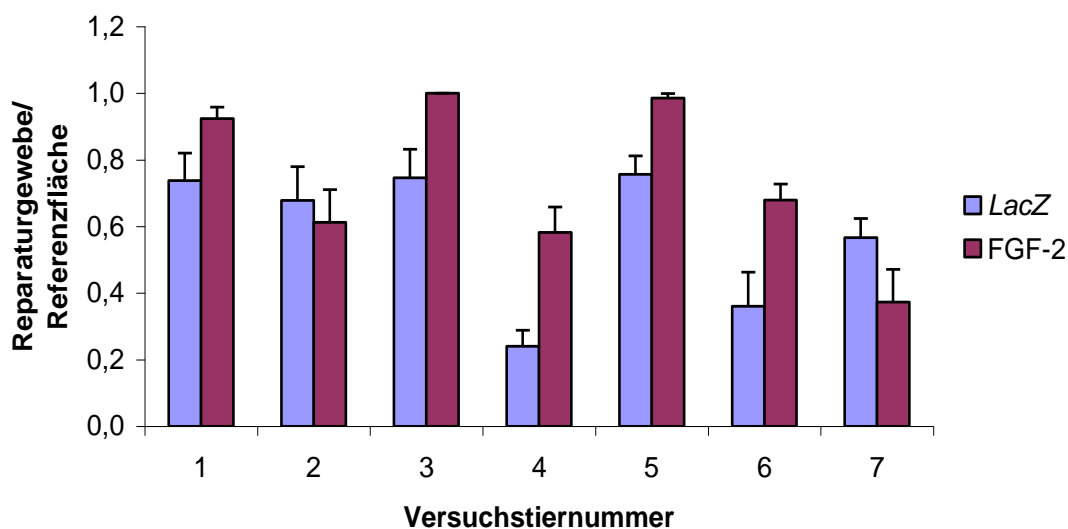


Diagramm 4.3: Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe nach 3 Wochen.

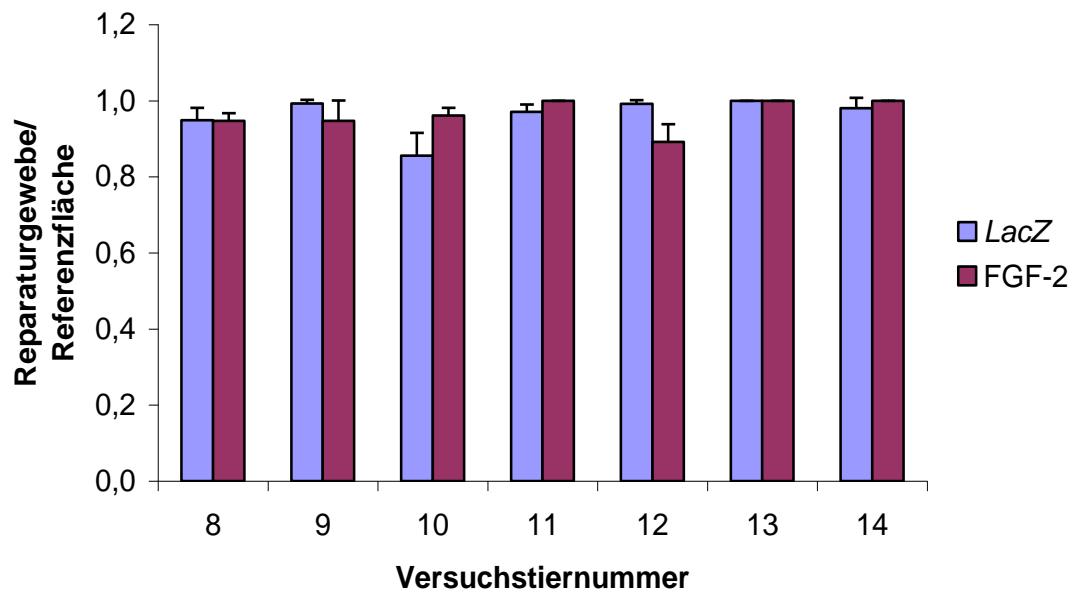


Diagramm 4.4: Prozentuale Defektfüllung mit Reparaturgewebe nach 14 Wochen.

#### 4.4.3 Prozentualer Anteil an hypertrophem Gewebe

Weder nach 3 noch nach 14 Wochen fand sich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Nach 3 Wochen fand sich in der *lacZ*-Gruppe kein hypertrophes Gewebe und in der FGF-2-Gruppe  $2,5 \pm 5,2 \%$  ( $p > 0,05$ ). Nach 14 Wochen lag der Wert in der *lacZ*- und FGF-2-Gruppe bei  $8,0 \pm 10,9$  bzw.  $2,9 \pm 4,5 \%$  ( $p > 0,05$ ).

#### 4.5 Zelldichte im Defekt

Die Zelldichte im Defekt wurde an Safranin-O-Echtgrün gefärbten Schnitten ( $n = 3$ ) an standardisierten Stellen ( $n = 5$ ) pro Defekt ermittelt (Tab. 4.1 und 4.2).

	<b><i>lacZ</i></b> (Zellzahl/mm <sup>2</sup> ±SD)	<b>FGF-2</b> (Zellzahl/mm <sup>2</sup> ±SD)	p-Wert
Tier 1	1930 ± 582	1938 ± 539	n.b.
Tier 2	1435 ± 671	2789 ± 482	n.b.
Tier 3	2320 ± 567	1768 ± 427	n.b.
Tier 4	928 ± 348	2066 ± 671	n.b.
Tier 5	1781 ± 731	1997 ± 412	n.b.
Tier 6	3521 ± 1066	1635 ± 858	n.b.
Tier 7	3242 ± 526	3505 ± 946	n.b.
<b>Mittelwert</b>	<b>2165 ± 939</b>	<b>2392 ± 616</b>	<b>&gt; 0.05</b>

Tab. 4.5: Zellzahl/mm<sup>2</sup> im Reparaturgewebe nach 3 Wochen.

	<b><i>lacZ</i></b> (Zellzahl/mm <sup>2</sup> ±SD)	<b>FGF-2</b> (Zellzahl/mm <sup>2</sup> ±SD)	p-Wert
Tier 1	1329 ± 427	1390 ± 229	n.b.
Tier 2	1407 ± 239	1628 ± 365	n.b.
Tier 3	1519 ± 438	1461 ± 262	n.b.
Tier 4	1222 ± 249	1206 ± 188	n.b.
Tier 5	1553 ± 407	1753 ± 339	n.b.
Tier 6	1150 ± 297	1148 ± 349	n.b.
Tier 7	1224 ± 461	1520 ± 374	n.b.
<b>Mittelwert</b>	<b>1343 ± 155</b>	<b>1444 ± 217</b>	<b>&gt; 0.05</b>

Tab. 4.6: Zellzahl/mm<sup>2</sup> im Reparaturgewebe nach 14 Wochen.

Der Mittelwert in der FGF-2-Gruppe war zu beiden Zeitpunkten etwas höher als in der *lacZ*-Gruppe ( $p > 0,05$ ). Die Zelldichte nahm im Verlauf der Reparaturvorgänge ab. Nach 14 Wochen (*lacZ*- und FGF-2-Gruppe zusammen) war diese statistisch signifikant niedriger als nach 3 Wochen (*lacZ*- und FGF-2-Gruppe zusammen). Nach 3 Wochen lag die Zelldichte bei  $2278 \pm 772$  Zellen/mm<sup>2</sup> und nach 14 Wochen bei  $1394 \pm 189$  Zellen/mm<sup>2</sup> ( $p < 0,001$ ).

## 4.6 Immunhistochemie

### 4.6.1 Typ-II-Kollagen

Das neu gebildete Reparaturgewebe wurde per Immunhistochemie auf Typ-II-Kollagen, eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels, untersucht. 3 Wochen nach der Transplantation der in Alginat verkapselten Chondrozyten war die Immunreaktivität in der *lacZ*-Gruppe geringer als in der FGF-2-Gruppe (siehe Tab. 4.3, Tab. 4.7, Abb. 4.2, G, H). Nach 14 Wochen war die Immunreaktivität in der *lacZ*-Gruppe etwas geringer oder nahezu gleich zum angrenzenden normalen Knorpel (siehe Tab. 4.3, Tab. 4.7, Abbildung 4.3, G, H). Alle Defekte der FGF-2-Gruppe zeigten eine dem angrenzenden gesunden Knorpel ähnliche Immunreaktivität gegenüber Typ-II-Kollagen.

	3 Wochen		14 Wochen	
	<i>lacZ</i>	FGF-2	<i>lacZ</i>	FGF-2
Tier 1	+	++	+	++
Tier 2	++	++	++	++
Tier 3	+	++	++	++
Tier 4	++	+	++	++
Tier 5	-	++	++	++
Tier 6	-	+++	+	++
Tier 7	++	+	++	++
	<b>- bis ++</b>	<b>+ bis +++</b>	<b>+ bis ++</b>	<b>++</b>

Tab. 4.7: Immunreaktivität für Typ-II-Kollagen.

#### 4.6.2 Typ-I-Kollagen

Typ-I-Kollagen findet sich im subchondralem Knochen und faserknorpeligem Reparaturgewebe von Knorpeldefekten. Nach 3 Wochen war die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen stärker im Reparaturgewebe der Defekte, die *lacZ*-Sphäroide erhalten hatten (siehe Tab. 4.4, Tab. 4.8, Abb. 3.2, I, K). Nach 14 Wochen hatte sich die Immunreaktivität in beiden Gruppen verringert, wobei diese weiterhin in der *lacZ*-Gruppe stärker ausgeprägt war (siehe Tab. 4.4, Tab. 4.7, Abb. 3.3, I, K).

	3 Wochen		14 Wochen	
	<i>lacZ</i>	FGF-2	<i>lacZ</i>	FGF-2
Tier 1	-	+	+	+
Tier 2	+	+	-	-
Tier 3	+	-	++	-
Tier 4	+	++	-	-
Tier 5	-	-	-	-
Tier 6	++	-	+	-
Tier 7	++	-	-	-
	- bis ++	- bis ++	- bis ++	- bis +

Tab. 4.8: Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen.



## **5. Diskussion**

### **5.1 Überblick**

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss der lokalen Stimulation der Reparatur von osteochondralen Defekten im Kaninchenknie durch die Transplantation von in Alginat verkapselten Chondrozyten, die den humanen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 überexprimieren. Nach 3 und 14 Wochen zeigte sich ein signifikant verbesserter Gesamtpunktwert des histologischen Bewertungssystems. Ebenso fand sich eine signifikante Verbesserung von Einzelparametern der Chondrogenese wie z.B. der Zellmorphologie und der Defektarchitektur. Es fanden sich histologisch keine negativen Effekte auf die Synovialmembran zu beiden Zeitpunkten. Das transplantierte Alginat wurde im Zeitverlauf resorbiert. Eine Bildung von hypertrophem Reparaturgewebe wurde nicht beobachtet.

### **5.2 Gentherapie und Gentransfer**

Ein Hauptproblem in der Anwendung von Wachstumsfaktoren zur Verbesserung der Reparatur von Knorpeldefekten ist ihre kurze Plasmahalbwertszeit. Eine wesentliche Herausforderung der Gentherapie in der Anwendung bei Gelenkknorpeldefekten ist die lokale und sichere Bereitstellung und Expression des therapeutischen Transgens. Speziell das Einbringen von FGF-2 in Gelenkdefekte bleibt weiterhin ein Problem. So wurde FGF-2 in anderen Studien z.B. durch eine einmalige intraartikuläre Gabe der hohen Dosis von 0,7 µg (Fujimoto 1999) oder über osmotische Pumpen bis zu zwei Wochen appliziert mit Dosen zwischen 3,6 ng (Chuma 2004) und 12 ng (Cuevas 1988). Der Gentransfer könnte hierzu eine Alternative sein, da die therapeutischen Faktoren direkt im Knorpeldefekt produziert werden und so vor Ort gezielt und langfristig ihre Wirkung entfalten. Hierdurch können auch systemische Nebenwirkungen minimiert werden. Ferner ist im Gegensatz zu einer konventionellen medikamentösen Therapie keine wiederholte Applikation zur Aufrechterhaltung pharmakologisch wirksamer Konzentrationen notwendig. Für einige Gensequenzen, die für Wachstumsfaktoren kodieren, wurde ein positiver Effekt auf die Knorpelheilung beobachtet, so z.B. für den insulinartigen Wachstumsfaktor I (IGF-I)

(Madry 2005, Goodrich 2007, Madry 2013), den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2) (Yokoo 2005, Cucchiariini 2005), den transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ -1) (Guo 2006, Ivkovic 2010) oder auch das knochenmorphogenetische Protein-7 (BMP-7) (Hidaka 2003, Che 2010).

FGF-2 transfizierte und in Alginat eingebrachte Chondrozyten setzen aktives FGF-2 für zumindest einen Monat *in vitro* frei (Kaul 2006). Die von uns verwendete nichtliposomale-Lipidmischung FuGENE6® hat als Vorteile eine hohe Gentransfereffizienz nach sorgfältiger Optimierung der Transferbedingungen (Madry 2000) sowie die Verwendbarkeit für verschiedene Zelllinien (Orth 2008, Yamano 2010). Außerdem ist es nicht immunogen und kann so mehrfach angewendet werden. Ein potentieller Nachteil dieser *ex vivo* Strategie ist der höhere Aufwand durch die Zellvermehrung *in vitro* und die damit verbundenen Kosten im Vergleich zu direkten Gentransfermethoden. Auch andere Gentransfermethoden werden in experimentellen Modellen der Reparatur von Gelenkknorpeldefekten erfolgsversprechend angewendet (Cucchiariini 2005). So konnten Yokoo et al. (2005) in einem ähnlichen Versuchsaufbau nach Transplantation von per rAAV-transfizierten FGF-2 überexprimierenden Chondrozyten eine Verbesserung der Defektreparatur beobachten.

### 5.3 Tiermodelle

Das Kaninchen-Tiermodell ermöglicht die Untersuchung der Knorpelreparatur unter physiologischen Bedingungen. Einflussfaktoren sind z.B. die mechanische Belastung der Gelenke und die Reaktion des Organismus auf die transplantierten Chondrozyten und das Transgen. Die Heilung von Knorpeldefekten ist ein komplexer Prozess (Buckwalter 1998), an dem der subchondrale Knochen (Madry 2010, Pape 2010, Orth 2013), das Knochenmark (Shapiro 1993) und die Synovialzellen (Hunziker 1996) teilhaben. Daher ist die Untersuchung anhand von Tiermodellen essentiell, um zum einen die Reparaturvorgänge im Knorpel besser zu verstehen und zum anderen den Wert neuer therapeutischer Methoden zu erforschen. Dies kann durch *in vitro*-Versuche nicht ersetzt werden (Sellers 1997).

Obwohl größere Tiere wie z.B. Schafe oder Pferde dem Menschen hinsichtlich Knorpeldicke, Extremitätenachsen und weiterer Charakteristika mehr ähneln mögen, ist das Kleintiermodell Kaninchen weithin akzeptiert, um erste *in vivo*-Studien

durchzuführen (O'Driscoll 1998, Chu 2010). Kaninchen eignen sich gut als Modelle um die prinzipielle Wirksamkeit einer Therapie zu untersuchen (Orth 2013). Eine Regeneration der Knorpeldefekte findet bei adulten Kaninchen nicht statt (Sellers 1997, 2000). In vielen weiteren Studien wurden ebenfalls Kaninchen als Versuchstiere verwendet (Shapiro 1993, Chuma 2004, Yamamoto 2004, Yokoo 2005, Evans 2009). Die Fähigkeit zur spontanen Reparatur von Gelenkknorpeldefekten ist abhängig vom Alter des Versuchstieres (Roughley 2001). Kaninchen erreichen nach 2-3 Monaten die sexuelle und nach 7-8 Monaten die skelettale Reife (Lavery 2010). Das Kniewachstum stoppt nach 3-4 Monaten (Hunziker 1998). In unserer Studie waren die Tiere bei Implantation der Alginatsphäroide in einem spät juvenilen Stadium und bei Explantation nach 14 Wochen ausgewachsen. Die intrinsische Heilungskapazität der Defekte war wie die Daten der Negativkontrolle beweisen nicht ausreichend. In einem nächsten Schritt ist die Evaluation an Großtiermodellen nötig.

Bei dem gewählten Untersuchungszeitpunkt von 3 Wochen kann die frühe Phase der Defektheilung untersucht werden. Nach 14 Wochen finden sich Zeichen der beginnenden Degeneration. Ähnliche Untersuchungsintervalle wurden in anderen Studien ebenfalls gewählt (Madry 2005, Yokoo 2005, Hiraide 2005, Pagnotto 2007, Vogt 2009). Es liegen aber auch Ergebnisse zu Beobachtungszeiträumen von bis zu einem Jahr vor (Sellers 2000, Orth 2012). Bei solch längeren Beobachtungszeiträumen können spät auftretende degenerative Veränderungen erfasst werden (Shapiro 1993). Die vorliegende Studie erlaubt daher Aussagen über den Effekt auf die initiale Reparatur osteochondraler Defekte.

#### **5.4 Alginat als Trägermedium für transplantierte Chondrozyten**

Alginat wird zur Verkapselung einer Vielzahl von therapeutisch potentiell interessanten Zellen genutzt (Lim 1980, Chang 1997). Für die Anwendung bei Chondrozyten ist hierbei ein wesentlicher Vorteil, dass diese im Alginatsystem ihren Phänotyp beibehalten und keine wesentliche Dedifferenzierung eintritt (Häuselmann 1996, Schulze 2000). Während die Chondrozyten hingegen nach mehreren Passagen in einer Monolayer-Kultur diese Fähigkeit verlieren (von der Mark 1977, Benya 1982, Diaz-Romero 2005, Andrade 2011). Dedifferenzierung bedeutet, dass anstelle des knorpelspezifischen Typ-II-Kollagens vermehrt Kollagen vom Typ I

produziert wird (Schulze 2000). Bonaventure et al. (1994) zeigten, dass dedifferenzierte Chondrozyten in einer Alginatmatrix beginnen wieder knorpelspezifische Gene zu exprimieren. So werden beispielsweise Aggrecan und Typ-II-Kollagen in einer Alginatmatrix stärker exprimiert als in einer Monolayer-Kultur (Mierisch 2003). Ferner können die Chondrozyten im Alginatsystem über einen Zeitraum von bis zu 9 Monaten eine stabile und knorpelspezifische extrazelluläre Matrix bilden, die ähnliche Eigenschaften wie die native Matrix des hyalinen Gelenkknorpels hat und reich an Proteoglykanen und Kollagenen ist (Häuselmann 1994). Eine stabile und gewebetypische extrazelluläre Matrix erscheint wichtig für ein funktionstüchtiges Gewebe zu sein. Ein weiterer Vorteil des Alginats ist, dass es passgenau in osteochondrale Defekte eingebracht werden kann (Mierisch 2003).

In unserer Studie wurden die Alginatsphäroide im Zeitverlauf abgebaut. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein (Rokstad 2001, Mierisch 2003, Heiligenstein 2011). Vor allem in der 3 Wochengruppe fanden sich Fissuren in den Alginatsphäroiden. Diese könnten durch die mechanische Belastung des Gelenkes erklärt sein, so behalten die Alginatsphäroide ihre strukturelle Integrität *in vitro* für bis zu 12 Wochen (Mierisch 2003). Diduch et al. (2000) fanden korrespondierend mit unseren Ergebnissen noch nach 12 Wochen Reste von Alginat in osteochondralen Defekte. In einer Studie von Almqvist et al. (2009) ließ sich 1 Jahr nach Transplantation von in Alginat verkapselten humanen allogenen Chondrozyten kein Alginat mehr nachweisen. Gründe für diesen Abbauvorgang der Sphäroide könnten eine Immunreaktion gegen das Alginat, die transplantierten allogenen Chondrozyten oder das Transgen sein. In einigen Präparaten zeigten sich lokal begrenzte entzündliche Infiltrate um die Alginatsphäroide. Heiligenstein et al. (2011) fanden 3 Wochen nach Transplantation von in verschiedenen Alginaten verkapselten Chondrozyten mehrkernige Riesenzellen, Lymphozyten, Eosinophile, Fibroblasten und einzelne Erythrozyten am Rand der Alginatsphäroide, was einen Resorptionsvorgang anzeigt. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die primäre Aufgabe der transplantierten Chondrozyten mehr in der Bereitstellung von bioaktivem FGF-2 als in der Repopulation des Defektes zu sehen ist. Mierisch et al. (2003) zeigten, dass die Zelldichte von in einem Alginatsystem transplantierten Chondrozyten über die Zeit abnimmt und es zu keiner Zellteilung in den Alginatsphäroiden kommt.

Zu beiden Zeitpunkten fanden sich keine Unterschiede der Alginatfläche zwischen der FGF-2- und der *lacZ*-Kontrollgruppe. FGF-2 scheint folglich keinen Einfluss auf die Resorption der Alginatsphäroide zu nehmen oder die Immunreaktion gegen diese zu beeinflussen. Dies wäre bei der klinischen Anwendung von Vorteil, da ein funktionierendes Immunsystem nach einem intraartikulären Eingriff wichtig ist, um postoperative Komplikationen wie z.B. Gelenkinfektionen zu minimieren. Interessant erscheint weiterhin, dass das verwendete Alginat nicht die Freisetzung des FGF-2 behindert. So konnten Madry et al. (2005) zeigen, dass die Freisetzung von IGF-I durch transfizierte Chondrozyten in Alginat nur ca. 2-fach abnahm verglichen mit einer Monolayerkultur.

## **5.5 Vergleich von Histomorphometrie und histologischen Bewertungssystemen**

Die histologischen Bewertungssysteme sind ein weithin anerkanntes Hilfsmittel zur Beurteilung der Heilung von Knorpeldefekten. Es werden mehrere Systeme verwendet, wie z.B. das Bewertungssystem nach Mankin (1971), nach Sellers (1997, 2000), nach Wakitani (1994) und nach Pineda (1992). Wir verwendeten das Bewertungssystem nach Sellers (Sellers 1997, Sellers 2000), bei dem es sich um ein nach Pineda und Wakitani modifiziertes System handelt. Dieses Bewertungssystem wurde laut der Autoren konzipiert um den Attributionsfehler zu reduzieren, feine Unterschiede während der Defektreparatur besser zu identifizieren und um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu ermöglichen und deckt alle wesentlichen Aspekte der Reparatur von osteochondralen Defekten ab (Orth 2012). So ermöglicht es die Vergleichbarkeit auch von individuellen Kategorien der Defektheilung und lässt einen Schluss darüber zu, welche Komponente der Defektheilung durch das therapeutische Agens insbesondere beeinflusst wird. Ein Vorteil der histologischen Bewertungssysteme ist der wesentlich geringere Zeitaufwand. Hierfür ist eine gewisse histologische Erfahrung notwendig und Kenntnisse über den Ablauf der Heilung von osteochondralen Defekten. Dies macht ferner vorstellbar, dass die Ergebnisse stärker von subjektiven Einflüssen und Erfahrungen abhängen. Durch die Benutzung einer computergestützten Analysesoftware sollen diese subjektiven Einflüsse minimiert werden. Hierdurch könnte ein noch besserer quantitativer und analytischer Vergleich zwischen

Kontrollgruppe und behandelter Gruppe möglich sein, gerade was die statistische Auswertung betrifft (Pastoureau 2003, Pastoureau 2010). Allerdings bleibt festzuhalten, dass z.B. das Setzen der Defektränder bei der Ausmessung der prozentualen Defektfüllung manuell erfolgte und so immer noch untersucherabhängig war. In dieser Studie zeigten sich zwischen den 3 Untersuchern nur geringe Unterschiede in der Auswertung mittels des histologischen Bewertungssystems. Auch stichprobenartig durchgeführte Messungen durch einen zweiten Untersucher zeigten bei den histomorphometrischen Messungen keine wesentliche Untersucherabhängigkeit. In den vorliegenden Studien nach Applikation von FGF-2 zur Verbesserung der Reparatur von Knorpeldefekten wurden histomorphometrische Verfahren nicht angewendet.

## **5.6. Synovialmembran**

Die Auswertung der Effekte der lokalen Überexpression von rekombinantem humanem FGF-2 auf die Synovialmembran erfolgte anhand eines bereits publizierten Bewertungssystems (Nixon 1999, Fortier 2002). Bei der Explantation der Kniegelenke zeigten sich zu beiden Zeitpunkten keine makroskopischen Zeichen einer Entzündung oder eines Hämatoms. Mikroskopisch war zu beiden Zeitpunkten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachzuweisen. Die lokale Applikation von FGF-2 führte nicht zu nachteiligen Effekten auf die Synovialmembran. Das Verfahren ist also nicht mit einer durch die allogenen Chondrozyten, das Transgen oder das Fremdmaterial Alginate ausgelösten starken entzündlichen Reaktion des Kniegelenks verbunden, was für die klinische Anwendung eine wichtige Voraussetzung ist. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien (Madry 2005, Madry 2010). Die Untersuchung der Synovialmembran erfolgte in weiteren vorliegenden tierexperimentellen Studien zur Heilung von Knorpeldefekten nach FGF-2-Applikation größtenteils nicht histologisch sondern allenfalls makroskopisch, sodass hier Vergleichswerte fehlen. Makroskopisch ließen sich keine negativen Effekte auf die Synovialmembran feststellen (Yokoo 2005, Maehara 2010). Die lokale Bereitstellung von FGF-2 durch die Chondrozyten könnte eine mögliche Verdünnung des Wachstumsfaktors in der Synovialflüssigkeit oder die Aufnahme durch Zellen der Synovialmembran vermeiden. In ähnlichen Versuchsanordnungen wurden keine erhöhten FGF-2

Spiegel in der Synovialflüssigkeit gemessen (Madry 2010). So werden höhere Wirkspiegel im Defekt erreicht. Ein weiterer möglicher Vorteil der lokalen Bereitstellung des Wachstumsfaktors könnte in der Vermeidung von unerwünschten Effekten der Therapie, wie z.B. Hyperplasien der Synovialmembran, liegen (Qu 1995). Manabe et al. (1999) zeigten, dass erhöhte endogene FGF-2-Spiegel eine Rolle bei der Gelenkzerstörung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis spielen.

### 5.7 Typ-I/-II-Kollagengehalt im Reparaturgewebe

Typ-I-Kollagen findet sich im subchondralem Knochen und dem fibrösem Reparaturgewebe von Knorpeldefekten (Roberts 2009). Typ-II-Kollagen stellt hingegen einen wesentlichen Bestandteil des gesunden Gelenkknorpels dar.

3 Wochen nach der Transplantation der in Alginat verkapselten Chondrozyten war die Immunreaktivität gegen Typ-II-Kollagen der *lacZ*-Defekte geringer als in der FGF-2-Gruppe. FGF-2 scheint also die Synthese von Typ-II-Kollagen in der frühen Defektheilung zu beschleunigen. Nach 14 Wochen war die Immunreaktivität in der *lacZ*-Gruppe etwas geringer oder nahezu ähnlich zum angrenzenden normalen Knorpel. Alle Defekte der FGF-2-Gruppe zeigten eine dem angrenzenden gesunden Knorpel ähnliche Immunreaktivität gegenüber Typ-II-Kollagen. Die FGF-2-induzierte Stimulation der Typ-II-Kollagensynthese wurde auch *in vitro* von Veilleux und Spector (2005) bestätigt. In weiteren *in vivo*-Studien zeigte sich eine vermehrte Anfärbbarkeit per immunhistochemischer Methoden (Cucchiariini 2005, Ishii 2007, Huang 2007, Maehara 2010). Im Gegensatz hierzu fanden Cucchiariini et al. (2009) keinen Unterschied der Typ-II-Kollagensynthese und der Immunreaktivität bei per rAAV-transfiziertem gesundem und arthrotischem humanem Knorpel *in vitro*. Gründe hierfür könnten unterschiedliche Konzentrationen der Wachstumsfaktoren und ein unterschiedliches biologisches Verhalten von humanen und Kaninchengelenkknorpel sein.

Nach 3 Wochen war die Immunreaktivität für Typ-I-Kollagen stärker im Reparaturgewebe der Defekte, die *lacZ*-Sphäroide erhalten hatten. Nach 14 Wochen hatte sich die Immunreaktivität in beiden Gruppen verringert, wobei diese weiterhin in der *lacZ*-Gruppe stärker ausgeprägt war. Maehara et al. (2010) konnten nach Applikation von FGF-2 über Hydroxyapatit/Kollagen Typ-I-Kollagen nach 12 und 24 Wochen nicht immunhistochemisch nachweisen. *In vitro* konnte eine verminderte

Expression von Typ-I-Kollagen an per rAAV-transfizierten FGF-2 überexprimierenden mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen werden (Cucchiariini 2011). Madry et al. (2010) fanden 3 Wochen postoperativ eine tendenzielle Zunahme der Immunreaktivität gegenüber Typ-I-Kollagen bei kombiniertem Gentransfer mit FGF-2 und IGF-I. Der Einsatz spezieller Software zur standardisierten Evaluation immunhistochemisch gefärbter Präparate könnte eine bessere Vergleichbarkeit der erhobenen Daten gewährleisten (Sellers 2000, Rojo 2009).

## 5.8 Strukturelle Knorpelreparatur

### 5.8.1 Knorpelreparatur nach 3 Wochen *in vivo*

Der Einfluss von FGF-2 auf die Kontrolle von Knorpelwachstum und -differenzierung während der Embryogenese ist gut belegt (Schofield 1990).

In der vorliegenden Studie wurden Unterschiede zwischen *lacZ*- und FGF-2-Gruppe in der Knorpeldefektheilung schon nach 3 Wochen beobachtet. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung in den Parametern Defektfüllung, Defektarchitektur und dem Gesamtpunktwert. FGF-2 wirkt beispielsweise mitogen auf Fibroblasten (Gospodarowicz 1974) oder Chondrozyten (Sah 1994, Trippel 1997, Madry 2004, Cucchiariini 2009). Darüber hinaus führt FGF-2 zu einer Migration von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark in Knorpeldefekte (Buckley-Sturrock 1989), was zu einer höheren Zelldichte führen kann. Die bessere Füllung der mit FGF-2-Alginatsphäroiden versorgten Defekte nach 3 Wochen könnte auch durch die stärkere Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in den Defekt hervorgerufen worden sein. So konnten Chuma et al. (2004) *in vitro* zeigen, dass FGF-2 die chemotaktische Migration von mesenchymalen Stammzellen konzentrationsabhängig bei einem Maximum von 10 ng/ml fördert.

In der 3 Wochengruppe lag der Mittelwert für Safranin-O-positives Gewebe in der *lacZ*- und FGF-2-Gruppe bei  $16 \pm 15$  % bzw.  $46 \pm 40$  % ( $p = 0,09$ ). Auffällig war die große interindividuelle Variabilität der Ergebnisse. So variierten die Ergebnisse der 3 Wochengruppe in der *lacZ*-Gruppe von 3 % zu 48 % und in der FGF-2-Gruppe von 5 % zu 100 %. Dies korrespondiert mit anderen Untersuchungen (Shapiro 1993, Oates 1995). Dahlberg und Kreicbergs (1991) schlossen, dass eine Auswertung der Regenerationsvorgänge der osteochondralen Defekte aufgrund dieser Variabilität



äußerst schwierig sei. Gerade diese Variabilität unterstreicht die herausragende Bedeutung einer detaillierten, objektiven Methode der histologischen Auswertung (Sellers 1997).

Ebenso ist eine verstärkte Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten nach Applikation von FGF-2 beschrieben, wobei unterschiedliche Signalkaskadeprozesse wie z.B. die Inhibierung von TGF- $\beta$  eine Rolle zu spielen scheinen (Ito 2008). FGF-2 führt zu einer verstärkten Sekretion mehrerer Wachstumsfaktoren, die im Rahmen der Knorpelreparatur eine Rolle spielen (Li 2013). Die verbesserte Defektarchitektur nach 3 Wochen kann durch die verstärkte Differenzierung zu Chondrozyten erklärt werden. Der verbesserte Gesamtpunktwert nach 3 Wochen ist das Ergebnis einer frühen Stimulation der Chondrogenese durch das überexprimierte FGF-2. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch nach Transplantation rAAV-transduzierter Chondrozyten in einem Typ-I-Kollagen-Gel (Yokoo 2005). Nach histologischer Evaluation mittels dem von Wakitani et al. (1994) entwickelten Bewertungssystems ließen sich nach 4 Wochen in der FGF-2-Gruppe bessere Ergebnisse als in der Kontroll-Gruppe dokumentieren. Ishii et al. (2007) konnten 8 Wochen nach Applikation von FGF-2 mittels eines Fibringels eine Verbesserung der Parameter Matrixanfärbbarkeit und Zellmorphologie sowie des Gesamtpunktwerts im histologischen Bewertungssystem nach Pineda (1992) nachweisen. Auch in der Arbeit von Maehara et al. (2010) stellten sich verbesserte Punktwerte für die Parameter Zellmorphologie, Matrixanfärbbarkeit, Defektfüllung, subchondraler Knochen, Oberflächenarchitektur und den Gesamtpunktwert 3 Wochen nach Gabe von 10  $\mu\text{g/ml}$  FGF-2 über ein Hydroxyapatit/Kollagen-Komposit dar.

### 5.8.2 Knorpelreparatur nach 14 Wochen *in vivo*

In der *lacZ*-Gruppe zeigte sich zwischen der 3 und 14 Wochengruppe eine statistisch signifikant verbesserte Heilung in den Parametern Defektfüllung, Defektarchitektur und dem Gesamtpunktwert. Diese Daten belegen das Fortschreiten des Heilungsprozesses und stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien (Hiraide 2005, Yokoo 2005).

Nach 14 Wochen war die Morphologie der defektausfüllenden Zellen sowie die Formation der *Tidemark* in der FGF-2-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

verbessert. Die Zellen in dem neu gebildeten Gewebe waren vorwiegend sphäroid und, für den hyalinen Knorpel typisch, teilweise in Säulen angeordnet. Die Verbesserung des Parameters Zellmorphologie legt nahe, dass auch Langzeiteffekte auf die Chondrogenese von FGF-2 auszugehen scheinen. Cucchiari et al. (2005) konnten in einem ähnlichen Versuchsaufbau nach 4 Monaten eine Verbesserung der Parameter Defektfüllung, Defektarchitektur und Zellmorphologie zeigen. Wie in unserer Arbeit war auch der Gesamtpunktwert statistisch signifikant verbessert. Der Punktwert lag vergleichbar bei 11,0, während er in unserer Arbeit bei 11,1 lag. Auch andere Arbeitsgruppen wiesen eine Verbesserung der Defektreparatur durch FGF-2 zu ähnlichen Untersuchungszeitpunkten anhand von histologischen Bewertungssystemen nach (Yokoo 2005, Hiraide 2005, Maehara 2010).

Nach 14 Wochen fand sich in beiden Gruppen eine nahezu vollständige Füllung der Knorpeldefekte, was auch in anderen Studien so beschrieben wurde (Shapiro 1993) und die vorhandene intrinsische Heilungskapazität verdeutlicht. Ähnlich wie bei der therapeutisch angewandten Pridie-Bohrung (Pridie 1959) können aus dem Knochenmark stammende mesenchymale Stammzellen in den Defekt einwandern und zu Chondrozyten differenzieren. Allerdings war der Anteil an Safranin-O-positivem Gewebe in der FGF-2 Gruppe deutlich höher ( $p > 0,05$ ), ein Hinweis auf einen höheren Gehalt des neugebildeten Knorpelgewebes an Proteoglykanen. Nakajima et al. (1998) wiesen an aus osteochondralen Defekten isolierten Chondrozyten *in vitro* durch die Applikation von FGF-2 eine vermehrte Typ-II-Kollagen-Bildung nach. Da Typ-II-Kollagen von den Chondrozyten gebildet wird, gibt dies Hinweise darauf, dass der nach Behandlung mit FGF-2 neugebildete Knorpel reicher an funktionsfähigen Chondrozyten ist und die Chondrogenese durch FGF-2 stimuliert wird. In den vorliegenden Studien wurde die Defektfüllung semiquantitativ im Rahmen der bereits erwähnten histologischen Bewertungssysteme bestimmt. So konnten Cucchiari et al. (2005) nach 4 Monaten eine statistisch signifikant bessere Defektfüllung feststellen. Maehara et al. (2010) fanden nach Applikation von FGF-2 mit einem Hydroxyapatit/Kollagen eine verbesserte Knorpeldicke nach 3 und 12 Wochen anhand des histologischen Bewertungssystems nach Wakitani. Ishii et al. (2007) konnten im Gegensatz hierzu im histologischen Bewertungssystem nach Pineda (1992) keine statistisch signifikante Verbesserung der Defektfüllung nach Applikation von FGF-2 über ein Fibringel feststellen. In der vorliegenden Arbeit zeigte

sich im histologischen Bewertungssystem nach Sellers eine statistisch verbesserte Defektfüllung nach 3 Wochen nicht aber nach 14 Wochen.

Für den Parameter hypertrophes Gewebe ergab sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Durch die Verwendung der FGF-2-Alginatsphäroide kam es also nicht zu einer überschießenden Reparaturreaktion als unerwünschte Nebenwirkung. Eine Osteophytenbildung nach Behandlung von osteochondralen Defekten mit BMP-2 überexprimierenden Zellen wurde beschrieben (Gelse 2003).

Obwohl FGF-2 mitogen für Fibroblasten (Gospodarowicz 1974) und Chondrozyten *in vitro* (Sah 1994, Trippel 1995, Madry 2004, Yokoo 2005, Cucchiari 2009) ist, konnte bei dieser *in vivo* Studie kein Einfluss von FGF-2 auf die Zelldichte im Defekt festgestellt werden. Gründe hierfür könnten z.B. ein wesentlicher Einfluss von FGF-2 auf die Zellteilung vor allem in Initialstadium der Defektheilung liegen. Ferner trägt ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF-I und TGF- $\beta$  zu den Vorgängen der Reparatur von osteochondralen Defekten bei. So steigert eine niedrige Dosis von FGF-2 (1 ng/ml) die Proliferation von humanem Gelenkknorpel in Kombination mit IGF-I, während hohe FGF-2 Dosen die anabole Aktivität von IGF-I inhibierten (Loeser 2005). In den vorliegenden Studien wurde die Zellzahl nicht *in vivo* bestimmt, sodass Vergleichszahlen fehlen.

Die therapeutischen Effekte durch FGF-2 waren bis zu 14 Wochen nachzuweisen. Interessanterweise waren zu diesem Zeitpunkt erste degenerative Veränderungen anhand der höheren Punktwerte für die Parameter *Tidemark* und Oberflächenarchitektur zu erkennen. In der *lacZ*-Gruppe formierte sich in keinem der Versuchstiere eine regelrechte *Tidemark*. Ferner fanden sich deutliche Fibrillationen, ein frühes Merkmal der arthrotischen Knorpeldegeneration (Pritzker 2006, Madry 2012). Sowohl im angrenzenden normalen Knorpel als auch an den Rändern des Defektes selbst ließen sich häufig Zell-Cluster nachweisen. In der Safranin-O-Echtgrün-Färbung war teilweise eine schwächere Anfärbung der Defektränder zu beobachten, was Zeichen eines Verlustes von Knorpelgrundsubstanz ist.

Da die Knorpeldefekte in der *lacZ*-Kontrollgruppe nicht regenerierten, ist dieses Modell dazu geeignet, die Heilung von Knorpeldefekten und den Einfluss therapeutischer Faktoren auf diese zu untersuchen. Zu keinem der Zeitpunkte fand sich in einer der Gruppen eine vollständige Regeneration der Defekte. Dies korrespondiert mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen und zeigt, dass keine spontane Regeneration von osteochondralen Defekten stattfindet. Die Defekte hatten

einen Durchmesser von 3,2 mm. Defekte mit einer größeren Fläche stellen experimentell und auch klinisch eine weitere Herausforderung dar. Defekte ähnlicher Größe wurden verwendet, um den Effekt der Überexpression von therapeutischen Genen auf die Knorpelheilung zu untersuchen (Mason 2000, Cucchiaroni 2005, Madry 2005, Evans 2009).

## 5.9 Ausblick

Die hier erhobenen Daten zeigen, dass die lokale Überexpression von FGF-2 die Reparaturvorgänge osteochondraler Defekte im Kaninchenmodell nach 3 und 14 Wochen verbessert. Dieses genbasierte Therapiemodell der lokalen Synthese therapeutischer Faktoren kann als Prototyp dienen, um die Wirkung anderer potentiell therapeutischer Moleküle zu eruieren. Es wird in Zukunft wichtig sein, andere Wachstumsfaktoren oder Kombinationen dieser zu testen, damit die Reparatur von Gelenkknorpeldefekten weiter verbessert werden kann. Die Ergebnisse weiterer Grundlagenforschung werden helfen, die Mechanismen der Knorpelreparatur besser zu verstehen (Madry 2014, Benneker 2014). Auch die Mechanismen der Alginatresorption müssen näher beleuchtet werden, um eine möglichst langfristige Expression des Transgens zu gewährleisten. Ebenso muss der Gentransfer selbst mittels nicht viraler und viraler Systeme weiter optimiert werden. Weiterhin sollte durch präklinische Tierversuche am Großtiermodell die Situation im menschlichen Organismus möglichst genau wiedergespiegelt werden. Die Durchführung von Langzeit-Experimenten ist notwendig, da die Ergebnisse einer chirurgischen Intervention beim Menschen in Jahren oder gar Jahrzehnten gemessen werden. Das Ziel aller experimentellen Ansätze ist letztlich die Anwendung am Menschen. Diese Ergebnisse können zur Entwicklung von sicheren genbasierten Strategien zur Therapie von menschlichen Knorpeldefekten beitragen. Jedoch kann die Gentherapie sicherlich nicht als alleiniges Therapiekonzept die klinischen Probleme in der Behandlung fokaler Knorpeldefekte lösen. In Ergänzung zu bereits etablierten Therapieverfahren kann sie aber dazu beitragen, die Therapiekonzepte weiter zu verbessern und einen klinischen Nutzen für die Patienten zu erreichen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*. 1986 Aug 1; 233(4763):545-8.
2. Almqvist KF, Dhollander AA, Verdonk PC, Forsyth R, Verdonk R, Verbruggen G. Treatment of cartilage defects in the knee using alginate beads containing human mature allogenic chondrocytes. *Am J Sports Med*. 2009 Oct;37(10):1920-9.
3. Altman RD, Kates J, Chun LE, Dean DD, Eyre D. Preliminary observations of chondral abrasion in a canine model. *Ann Rheum Dis*. 1992 Sep;51(9):1056-62.
4. Anderson DD, Chubinskaya S, Guilak F, Martin JA, Oegema TR, Olson SA, Buckwalter JA. Post-traumatic osteoarthritis: improved understanding and opportunities for early intervention. *J Orthop Res*. 2011 Jun;29(6):802-9.
5. Andrade LR, Arcanjo KD, Martins HS, dos Reis JS, Farina M, Borojevic R, Duarte ME. Fine structure and molecular content of human chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Cell Biol Int*. 2011 Mar 1;35(3):293-7.
6. Bedi A, Feeley BT, Williams RJ 3rd. Management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Apr;92(4):994-1009.
7. Benneker LM, Cucchiaroni M, Madry H, Guilak F, Saris DB, Stoddart MJ, Koon Wong M, Roughley P. A vision on the future of articular cartilage repair. *Eur Cell Mater*. 2014 May 6;27:12-6.
8. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982 Aug;30(1):215-24.
9. Bert JM, Maschka K. The arthroscopic treatment of unicompartmental gonarthrosis: a five-year follow-up study of abrasion arthroplasty plus arthroscopic debridement and arthroscopic debridement alone. *Arthroscopy*. 1989;5(1):25-32.
10. Bikfalvi A, Savona C, Perollet C, Javerzat S. New insights in the biology of fibroblast growth factor-2. *Angiogenesis*. 1998;1(2):155-73.
11. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994 May;212(1):97-104.
12. Bora FW Jr, Miller G. Joint physiology, cartilage metabolism, and the etiology of osteoarthritis. *Hand Clin*. 1987 Aug;3(3):325-36.

13. Braun S, Vogt S, Imhoff AB. Stage oriented surgical cartilage therapy. Current situation. *Orthopäde*. 2007 Jun;36(6):589-99; quiz 600.
14. Braun S, Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture and specific rehabilitation for treating osteoarthritis of the knee. Indications, surgical technique, and rehabilitation protocol. *Z Rheumatol*. 2009 Dec;68(10):811-8.
15. Breinan HA, Martin SD, Hsu HP, Spector M. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res*. 2000 Sep;18(5):781-9.
16. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Oct 6;331(14):889-95.
17. Bruns J. Osteochondrosis dissecans. *Orthopäde*. 1997 Jun;26(6):573-84.
18. Buckley-Sturrock A, Woodward SC, Senior RM, Griffin GL, Klagsbrun M, Davidson JM. Differential stimulation of collagenase and chemotactic activity in fibroblasts derived from rat wound repair tissue and human skin by growth factors. *J Cell Physiol*. 1989 Jan;138(1):70-8.
19. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lect*. 1983;32:349-70.
20. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 1998;47:487-504.
21. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ: Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect*. 2005; 54: 465–80.
22. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:575-606.
23. Chang PL. Microcapsules as bio-organs for somatic gene therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Dec 31;831:461-73.
24. Che JH, Zhang ZR, Li GZ, Tan WH, Bai XD, Qu FJ. Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010 Apr; 18(4): 496-503.
25. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Feb;16(1):105-15.
26. Chuma H, Mizuta H, Kudo S, Takagi K, Hiraki Y. One day exposure to FGF-2 was sufficient for the regenerative repair of full-thickness defects of articular cartilage in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Oct;12(10):834-42.

27. Cotten M, Längle-Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(11):4033-7.
28. Cucchiaroni M, Madry H. Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med*. 2005 Dec;7(12):1495-509.
29. Cucchiaroni M, Madry H, Ma C, Thurn T, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Terwilliger EF. Improved tissue repair in articular cartilage defects in vivo by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2. *Mol Ther*. 2005 Aug;12(2):229-38.
30. Cucchiaroni M, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H. Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med*. 2009 Aug;13(8B):2476-88.
31. Cucchiaroni M, Schetting S, Terwilliger EF, Kohn D, Madry H. rAAV-mediated overexpression of FGF-2 promotes cell proliferation, survival, and alpha-SMA expression in human meniscal lesions. *Gene Ther*. 2009 Nov;16(11):1363-72.
32. Cucchiaroni M, Ekici M, Schetting S, Kohn D, Madry H. Metabolic Activities and Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Following rAAV-Mediated Gene Transfer and Overexpression of Fibroblast Growth Factor 2. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar 18.
33. Cuevas P, Burgos J, Baird A. Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988 Oct 31;156(2):611-8.
34. Czitrom AA, Langer F, McKee N, Gross AE. Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Jul;(208)
35. Dahlberg L, Kreicbergs A. Demineralized allogeneic bone matrix for cartilage repair. *J Orthop Res*. 1991 Jan;9(1):11-9.
36. Diao H, Wang J, Shen C, Xia S, Guo T, Dong L, Zhang C, Chen J, Zhao J, Zhang J. Improved cartilage regeneration utilizing mesenchymal stem cells in TGF-beta1 gene-activated scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2009 Sep;15(9):2687-98.
37. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nesic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):731-42.
38. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy*. 2000 Sep;16(6):571-7.



39. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Oct;62(19-20):2241-56.
40. Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S214-9
41. Evans CH, Liu FJ, Glatt V, Hoyland JA, Kirker-Head C, Walsh A, Betz O, Wells JW, Betz V, Porter RM, Saad FA, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Harris MB, Vrahas MS. Use of genetically modified muscle and fat grafts to repair defects in bone and cartilage. *Eur Cell Mater.* 2009 Dec 31;18:96-111.
42. Figueroa D, Meleán P, Calvo R, Gili F, Zilleruelo N, Vaisman A. Osteochondral autografts in full thickness patella cartilage lesions. *Knee.* 2011 Aug;18(4):220-3.
43. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* 2002 Mar;84(2):276-88.
44. Fortier LA, Deak MM, Semevolos SA, Cerione RA. Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res.* 2004 Mar;22(2):436-45.
45. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011 Mar 15
46. Frenz DA, Liu W, Williams JD, Hatcher V, Galinovic-Schwartz V, Flanders KC, Van de Water TR. Induction of chondrogenesis: requirement for synergistic interaction of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta. *Development.* 1994 Feb;120(2):415-24.
47. Fujimoto E, Ochi M, Kato Y, Mochizuki Y, Sumen Y, Ikuta Y. Beneficial effect of basic fibroblast growth factor on the repair of full-thickness defects in rabbit articular cartilage. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1999;119(3-4):139-45.
48. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, Park J, Schneider H. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* 2003 Feb;48(2):430-41.
49. Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T. Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Oct 20;92(14):2470-90.
50. Goodrich LR, Hidaka C, Robbins PD, Evans CH, Nixon AJ. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine model. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 May;89(5):672-85.

51. Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*. 1974 May 10;249(453):123-7.
52. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ*. 1986 Jul;19(1):1-17.
53. Gospodarowicz D. Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;638:1-8.
54. Guo X, Zheng Q, Yang S, Shao Z, Yuan Q, Pan Z, Tang S, Liu K, Quan D. Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor beta1 gene. *Biomed Mater*. 2006 Dec;1(4):206-15.
55. Hanada K, Solchaga LA, Caplan AI, Hering TM, Goldberg VM, Yoo JU, Johnstone B. BMP-2 induction and TGF-beta 1 modulation of rat periosteal cell chondrogenesis. *J Cell Biochem*. 2001 Mar 26;81(2):284-94.
56. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992 Feb 1;6(3):861-70.
57. Harris JD, Siston RA, Pan X, Flanigan DC. Autologous chondrocyte implantation: a systematic review. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Sep 15;92(12):2220-33.
58. Heiligenstein S, Cucchiarini M, Laschke MW, Bohle RM, Kohn D, Menger MD, Madry H. Evaluation of nonbiomedical and biomedical grade alginates for the transplantation of genetically modified articular chondrocytes to cartilage defects in a large animal model in vivo. *J Gene Med*. 2011 Apr;13(4):230-42.
59. Heiligenstein S, Cucchiarini M, Laschke MW, Bohle RM, Kohn D, Menger MD, Madry H. In vitro and in vivo characterization of nonbiomedical- and biomedical-grade alginates for articular chondrocyte transplantation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011 Aug;17(8)
60. Heinegård D. Proteoglycans and more--from molecules to biology. *Int J Exp Pathol*. 2009 Dec;90(6):575-86. Review.
61. Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, Warren RF, Crystal RG, Nixon AJ. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):573-83.
62. Hiraide A, Yokoo N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Saito T. Repair of articular cartilage defect by intraarticular administration of basic fibroblast growth factor gene, using adeno-associated virus vector. *Hum Gene Ther*. 2005 Dec;16(12):1413-21.

63. Huang X, Yang D, Yan W, Shi Z, Feng J, Gao Y, Weng W, Yan S. Osteochondral repair using the combination of fibroblast growth factor and amorphous calcium phosphate/poly(L-lactic acid) hybrid materials. *Biomaterials*. 2007 Jul;28(20):3091-100.
64. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*. 1996 May;78(5):721-33.
65. Hunziker EB, Kapfinger E. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br*. 1998 Jan;80(1):144-50.
66. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002 Jun;10(6):432-63.
67. Hunziker EB, Quinn TM. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:85-92.
68. Häbler C. Experimentelle Untersuchungen über die Regeneration des Gelenkknorpels. *Klin Chir*. 1925; 134: 602-640.
69. Häuselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*. 1994 Jan;107 ( Pt 1):17-27.
70. Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA, Thonar EJ. Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am J Physiol*. 1996 Sep;271(3 Pt 1):C742-52.
71. Imhoff AB, Burkart A, Ottl GM. Transfer of the posterior femoral condyle. First experience with a salvage operation. *Orthopäde*. 1999 Jan;28(1):45-51
72. Ishii I, Mizuta H, Sei A, Hirose J, Kudo S, Hiraki Y. Healing of full-thickness defects of the articular cartilage in rabbits using fibroblast growth factor-2 and a fibrin sealant. *J Bone Joint Surg Br*. 2007 May;89(5):693-700.
73. Ito T, Sawada R, Fujiwara Y, Tsuchiya T. FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. *Cytotechnology*. 2008 Jan;56(1):1-7.
74. Itoh N, Ornitz DM. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem*. 2011 Feb;149(2):121-30. Review.

75. Ivkovic A, Pascher A, Hudetz D, Maticic D, Jelic M, Dickinson S, Loparic M, Haspl M, Windhager R, Pecina M. Articular cartilage repair by genetically modified bone marrow aspirate in sheep. *Gene Ther.* 2010 Jun;17(6):779-89.
76. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am.* 2001 Jan;83-A(1):53-64.
77. Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jun 10;1135(2):185-99.
78. Jentsch KD, Wellnitz G, Heder G, Petzold E, Buntrock P, Oehme P. Acta Biol Med Ger. 1980;39(8-9):967-71. A bovine brain fraction with fibroblast growth factor activity inducing articular cartilage regeneration in vivo. *Acta Biol Med Ger.* 1980;39(8-9):967-71.
79. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* 1986;2(1):54-69.
80. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S306-17. Review.
81. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.* 1990 Jun;110(6):2195-207.
82. Kanda S, Lerner EC, Tsuda S, Shono T, Kanetake H, Smithgall TE. The nonreceptor protein-tyrosine kinase c-Fes is involved in fibroblast growth factor-2-induced chemotaxis of murine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10105-11.
83. Kaul G, Cucchiaroni M, Arntzen D, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2006 Jan;8(1):100-11.
84. Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am.* 1991 Oct;73(9):1301-15.
85. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem.* 1992 Jun;25(3):155-63.
86. Lavery S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Oct;18 Suppl 3:S53-65

87. Li X, Su G, Wang J, Zhou Z, Li L, Liu L, Guan M, Zhang Q, Wang H. Exogenous bFGF promotes articular cartilage repair via up-regulation of multiple growth factors. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Oct;21(10):1567-75.
88. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980 Nov 21;210(4472):908-10.
89. Loeser RF, Chubinskaya S, Pacione C, Im HJ. Basic fibroblast growth factor inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3910-7.
90. Lotz MK, Kraus VB. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):211
91. Lu HH, Subramony SD, Boushell MK, Zhang X. Tissue engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces. *Ann Biomed Eng*. 2010 Jun;38(6):2142-54.
92. Lützner J, Kasten P, Günther KP, Kirschner S: Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 309–16.
93. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol*. 2005 Mar;36(3):207-15.
94. Madry H, Trippel SB. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther*. 2000 Feb;7(4):286-91.
95. Madry H, Cucchiari M, Terwilliger EF, Trippel SB. Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Hum Gene Ther*. 2003 Mar 1;14(4):393-402.
96. Madry H, Cucchiari M, Stein U, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB. Sustained transgene expression in cartilage defects in vivo after transplantation of articular chondrocytes modified by lipid-mediated gene transfer in a gel suspension delivery system. *J Gene Med*. 2003 Jun;5(6):502-9.
97. Madry H. Operative und rekonstruktive Behandlung. In: Wirth CJ, Zichner L, Kohn D. *Orthopädie und orthopädische Chirurgie. Knie*. Thieme. Stuttgart. 2004. 367-79
98. Madry H, Kaul G, Cucchiari M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther*. 2005 Aug;12(15):1171-9.

99. Madry H, Weimer A, Kohn D, Cucchiarini M. *Tissue Engineering* zur Knorpelreparatur verbessert durch Gentransfer - Aktuelle Forschungsergebnisse und Literaturübersicht. *Orthopäde*, 2007, 36: 236-247.
100. Madry H, Pape D. Autologous chondrocyte transplantation. *Orthopäde*. 2008 Aug;37(8):756-63.
101. Madry H, Orth P, Kaul G, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Cucchiarini M. Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010 Oct;130(10):1311-22.
102. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010 Apr;18(4):419-33.
103. Madry H, Cucchiarini M. Clinical potential and challenges of using genetically modified cells for articular cartilage repair. *Croat Med J*. 2011 Jun;52(3):245-61.
104. Madry H, Grün UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Oct;108(40):669-77.
105. Madry H, Luyten FP, Facchini A. Biological aspects of early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Mar;20(3):407-22.
106. Madry H, Kaul G, Zurakowski D, Vunjak-Novakovic G, Cucchiarini M. Cartilage constructs engineered from chondrocytes overexpressing IGF-I improve the repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Eur Cell Mater*. 2013 Apr 16;25:229-47.
107. Madry H, Alini M, Stoddart MJ, Evans C, Miclau T, Steiner S. Barriers and strategies for the clinical translation of advanced orthopaedic tissue engineering protocols. *Eur Cell Mater*. 2014 May 6;27:17-21.
108. Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*. 2010 May;28(5):677-86.
109. Manabe N, Oda H, Nakamura K, Kuga Y, Uchida S, Kawaguchi H. Involvement of fibroblast growth factor-2 in joint destruction of rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 Aug;38(8):714-20.
110. Mandl EW, Jahr H, Koevoet JL, van Leeuwen JP, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ. Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture. *Matrix Biol*. 2004 Jul;23(4):231-41.

111. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971 Apr;53(3):523-37.
112. Mariani E, Pulsatelli L, Facchini A. Signaling pathways in cartilage repair. *Int J Mol Sci.* 2014 May 15;15(5):8667-98.
113. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:106-10.
114. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Oct;(379 Suppl):S171-8.
115. Merx, H., Dreinhofer, K. E. & Gunther, K. P. Socioeconomic relevance of osteoarthritis in Germany. *Z. Orthop. Unfall.* 145, 421–429 (2007)
116. Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjöld ML, Rekosh D, Balian G, Diduch DR. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Sep;85-A(9):1757-67.
117. Minzlaff P, Braun S, Haller B, Wörtler K, Imhoff AB. Autologous transfer of the posterior femoral condyle for large osteochondral lesions of the knee: 5-year results of the Mega-OATS technique. *Orthopäde.* 2010 Jun;39(6):631-6.
118. Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y. Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Jul;12(7):586-96.
119. Mont MA, Marker DR, Zywił MG, Carrino JA. Osteonecrosis of the knee and related conditions. *J Am Acad Orthop Surg.* 2011 Aug;19(8):482-94.
120. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendall DH, Hollingsworth JC, Ashton CM, Wray NP. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 2002 Jul 11;347(2):81-8.
121. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science.* 1993 May 14;260(5110):926-32.
122. Musumeci G, Castrogiovanni P, Leonardi R, Trovato FM, Szychlinska MA, Di Giunta A, Loreto C, Castorina S. New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *World J Orthop.* 2014 Apr 18;5(2):80-88
123. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res.* 1991 Aug;195(2):492-503.

124. Nakajima H, Goto T, Horikawa O, Kikuchi T, Shinmei M. Characterization of the cells in the repair tissue of full-thickness articular cartilage defects. *Histochem Cell Biol*. 1998 Apr;109(4):331-8.
125. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Aug;(365):149-62.
126. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med* 2010; 38: 1110-6.
127. Nixon AJ, Fortier LA, Williams J, Mohammed H. Enhanced repair of extensive articular defects by insulin-like growth factor-I-laden fibrin composites. *J Orthop Res*. 1999 Jul;17(4):475-87.
128. Oates KM, Chen AC, Young EP, Kwan MK, Amiel D, Convery FR. Effect of tissue culture storage on the in vivo survival of canine osteochondral allografts. *J Orthop Res*. 1995 Jul;13(4):562-9.
129. O'Connor WJ, Botti T, Khan SN, Lane JM. The use of growth factors in cartilage repair. *Orthop Clin North Am*. 2000 Jul;31(3):399-410.
130. O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1998 Dec;80(12):1795-812.
131. Orth P, Weimer A, Kaul G, Kohn D, Cucchiarini M, Madry H. Analysis of novel nonviral gene transfer systems for gene delivery to cells of the musculoskeletal system. *Mol Biotechnol*. 2008 Feb;38(2):137-44.
132. Orth P, Kaul G, Cucchiarini M, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Madry H. Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011 Feb 25.
133. Orth P, Cucchiarini M, Kaul G, Ong MF, Gräber S, Kohn DM, Madry H. Temporal and spatial migration pattern of the subchondral bone plate in a rabbit osteochondral defect model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Oct;20(10):1161-9.
134. Orth P, Zurakowski D, Alini M, Cucchiarini M, Madry H. Reduction of Sample Size Requirements by Bilateral Versus Unilateral Research Designs in Animal Models for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Apr 25.
135. Orth P, Cucchiarini M, Kohn D, Madry H. Alterations of the subchondral bone in osteochondral repair--translational data and clinical evidence. *Eur Cell Mater*. 2013 Jun 28;25:299-316; discussion 314-6.



136. Otsuka Y, Mizuta H, Takagi K, Iyama K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Suzuki F, Hiraki Y. Requirement of fibroblast growth factor signaling for regeneration of epiphyseal morphology in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Dev Growth Differ.* 1997 Apr;39(2):143-56.
137. Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair. *Gene Ther.* 2007 May;14(10):804-13.
138. Pape D, Filardo G, Kon E, van Dijk C, Madry H: Disease-specific clinical problems associated with the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010; 18: 448–62
139. Pastoureau P, Leduc S, Chomel A, De Ceuninck F. Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Jun;11(6):412-23.
140. Pastoureau PC, Hunziker EB, Pelletier JP. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010 Oct;18 Suppl 3:S106-12.
141. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel).* 1992;143(4):335-40.
142. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. Proceedings of the British Orthopaedic Association. *J Bone Joint Surg Br.* 1959 41: 618-19.
143. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006 Jan;14(1):13-29.
144. Qu Z, Huang XN, Ahmadi P, Andresevic J, Planck SR, Hart CE, Rosenbaum JT. Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Lab Invest.* 1995 Sep;73(3):339-46.
145. Redman SN, Dowthwaite GP, Thomson BM, Archer CW. The cellular responses of articular cartilage to sharp and blunt trauma. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004 Feb;12(2):106-16.
146. Robert H. Chondral repair of the knee joint using mosaicplasty. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2011 Jun;97(4):418-29
147. Roberts S, Menage J, Sandell LJ, Evans EH, Richardson JB. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *Knee.* 2009 Oct;16(5):398-404.

148. Rojo MG, Bueno G, Slodkowska J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009 Jan;47(3):349-54.
149. Rokstad AM, Kulseng B, Strand BL, Skjåk-Braek G, Espevik T. Transplantation of alginate microcapsules with proliferating cells in mice: capsular overgrowth and survival of encapsulated cells of mice and human origin. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Nov;944:216-25.
150. Romeis R. *Mikroskopische Technik.* 1989. München, Urban und Schwarzenberg.
151. Rosenberg L. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1971 Jan;53(1):69-82.
152. Rosenberg MB, Friedmann T, Robertson RC, Tuszynski M, Wolff JA, Breakefield XO, Gage FH. Grafting genetically modified cells to the damaged brain: restorative effects of NGF expression. *Science.* 1988 Dec 16;242(4885):1575-8.
153. Roughley PJ. Age-associated changes in cartilage matrix: implications for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct;(391 Suppl):S153-60.
154. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB. Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 1994 Jan;308(1):137-47.
155. Santos E, Zarate J, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Biomaterials in cell microencapsulation. *Adv Exp Med Biol.* 2010;670:5-21.
156. Schiebeler H, Schmidt W, Zilles H. *Anatomie.* Springer Verlag. 1999.
157. Schnettler R, Horas U, Meyer C. Autologous osteochondral transplants. *Orthopäde.* 2008 Aug;37(8):734-42.
158. Schofield JN, Wolpert L. Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res.* 1990 Nov;191(1):144-8.
159. Schulze M, Kuettner KE, Cole AA. Adult human chondrocytes in alginate culture. Preservation of the phenotype for further use in transplantation models. *Orthopäde.* 2000 Feb;29(2):100-6.
160. Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Büning H, Hallek M, Bräuchle C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1929-32.
161. Sellers RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1997 Oct;79(10):1452-63.

162. Sellers RS, Zhang R, Glasson SS, Kim HD, Peluso D, D'Augusta DA, Beckwith K, Morris EA. Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am.* 2000 Feb;82(2):151-60.
163. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Apr;75(4):532-53.
164. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB. Growth factor transgenes interactively regulate articular chondrocytes. *J Cell Biochem.* 2013 Apr;114(4):908-19.
165. Shida J, Jingushi S, Izumi T, Iwaki A, Sugioka Y. Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res.* 1996 Mar;14(2):265-72.
166. Slack JM, Darlington BG, Heath JK, Godsave SF. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature.* 1987 Mar 12-18;326(6109):197-200.
167. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopäde.* 1999 Jan;28(1):26-32.
168. Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D, Doctrow SR. Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Feb;75(2):177-89.
169. Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect.* 1997;46:473-6.
170. Tokuhara Y, Wakitani S, Imai Y, Kawaguchi A, Fukunaga K, Kim M, Kadoya Y, Takaoka K. Repair of experimentally induced large osteochondral defects in rabbit knee with various concentrations of *Escherichia coli*-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int Orthop.* 2010 Jun;34(5):761-7.
171. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg.* 2003 Nov-Dec;11(6):421-30.
172. Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Apr;13(4):278-86.
173. Vogt S, Wexel G, Tischer T, Schillinger U, Ueblacker P, Wagner B, Hensler D, Wilisch J, Geis C, Wübbenhorst D, Aigner J, Gerg M, Krüger A, Salzmann GM, Martinek V, Anton M, Plank C, Imhoff AB, Gansbacher B. The influence of the stable expression of BMP2 in fibrin clots on the remodelling and repair of osteochondral defects. *Biomaterials.* 2009 Apr;30(12):2385-92.

174. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 1977 Jun 9;267(5611):531-2.
175. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994 Apr;76(4):579-92.
176. Yamamoto T, Wakitani S, Imoto K, Hattori T, Nakaya H, Saito M, Yonenobu K. Fibroblast growth factor-2 promotes the repair of partial thickness defects of articular cartilage in immature rabbits but not in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Aug;12(8):636-41.
177. Yamano S, Dai J, Moursi AM. Comparison of transfection efficiency of nonviral gene transfer reagents. *Mol Biotechnol*. 2010 Nov;46(3):287-300.
178. Yokoo N, Saito T, Uesugi M, Kobayashi N, Xin KQ, Okuda K, Mizukami H, Ozawa K, Koshino T. Repair of articular cartilage defect by autologous transplantation of basic fibroblast growth factor gene-transduced chondrocytes with adeno-associated virus vector. *Arthritis Rheum*. 2005 Jan;52(1):164-70.

## 7. Publikationen

Kaul G, Cucchiarini M, **Arntzen D**, Zurakowski D, Menger MD, Kohn D, Trippel SB, Madry H. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in vivo. *J Gene Med.* 2006 Jan;8(1):100-11.

## 8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Experimentelle Orthopädie der Klinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, erstellt. Mein herzlicher Dank gilt:

*Prof. Dr. med. H. Madry.* Seine intensive, ausdauernde und freundschaftliche, fachliche wie persönliche Betreuung sowie seine kritischen Anmerkungen waren für mich von unschätzbarem Wert.

*Prof. Dr. rer. nat. M. Cucchiaroni* für Ihre freundliche Hilfestellung und fundierten Ratschläge, die für mich wertvolle Anregungen darstellten.

*Prof. Dr. med. D. Kohn.* Seine großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit war mir eine große Hilfe.

*Dr. rer. nat. G. Kaul* für seine Betreuung und stete Hilfsbereitschaft bei der Arbeit im Labor.

*D. Zurakowski, Ph.D.,* für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

*T. Thurn* für ihre technische Unterstützung.

